UNIVERSITÉ DE BORDEAUX

FACULTÉ MIXTE DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE

1956 – N° 387

RECHERCHES ANALYTIQUES ET BIOCHIMIQUES SUR LE CHROMOGÈNE LEUCO-ANTHOCYANIQUE DE LA GRAINE D'ARACHIDE

(Arachis hypogaea L.)

THÈSE POUR LE DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ

Mention "PHARMACIE"

Présentée et soutenue publiquement le Jeudi 26 Janvier 1956

PAR

Geneviève-Marie-Françoise LEFÈVRE

née BONHOMME

PHARMACIEN

Née à Les Aubiers (Deux-Sèvres), le 8 Septembre 1923.

Examinateurs de la Thèse :

MM. TAYEAU, professeur..... *Président*

VITTE, professeur.....

PAUTRIZEL, professeur..... *Juges*

MASQUELIER, maître de conférences agrégé

BORDEAUX

IMPRIMERIE E. DROUILLARD

3, PLACE DE LA VICTOIRE, 3

1956

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41547307_0079

UNIVERSITÉ DE BORDEAUX

FACULTÉ MIXTE DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE

1956 — N° 387

RECHERCHES ANALYTIQUES ET BIOCHIMIQUES SUR LE CHROMOGÈNE LEUCO-ANTHOCYANIQUE DE LA GRAINE D'ARACHIDE

(Arachis hypogaea L.)

THÈSE POUR LE DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ

Mention "PHARMACIE"

Présentée et soutenue publiquement le Jeudi 26 Janvier 1956

PAR

Geneviève-Marie-Françoise LEFÈVRE
née BONHOMME

PHARMACIEN

Née à Les Aubiers (Deux-Sèvres), le 8 Septembre 1923.

Examinateurs de la Thèse :

MM. TAYEAU, professeur..... *Président*
VITTE, professeur.....
PAUTRIZEL, professeur..... *Juges*
MASQUELIER, maître de conférences agrégé

U. UNIV. BIBLIOTHEEK LEIDEN

BORDEAUX
IMPRIMERIE E. DROUILLARD
3, PLACE DE LA VICTOIRE, 3

1956

FACULTÉ DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE DE BORDEAUX

DOYENS HONORAIRES : MM. DUPERIÉ, CHELLE, G. PORTMANN.

DOYEN : M. SIGALAS. — ASSESSEUR : M. TAYEAU.

PROFESSEURS HONORAIRES :

MM. A. MANDOUL, ANDERODIAS, ROCHER, LANDE, DUVERGEY, CARLES, LEURET, PÉRY, CHARRIER, DUBREUIL, CRUCHET, PERRENS

PROFESSEURS :

	MM.
Clinique médicale	N. BROUSTET
Clinique chirurgicale	PAPIN MASSE
Clinique d'accouchements	M. RIVIÈRE
Clinique gynécologique	MAGENDIE
Anatomie pathologique et microscopie clinique	DE GRAILLY
Anatomie	DUFOUR
Anatomie générale et histologie	MAYER
Hygiène et Clinique de la tuberculose	PIECHAUD
Médecine légale et médecine du travail	DERVILLÉE
Electroradiologie et clinique d'électricité médicale	REBOUL
Chimie	MESNARD
Matière médicale	J. GOLSE
Pharmacie	VITTE
Physiologie	FABRE
Clinique médicale des maladies des enfants	FONTAN
Zoologie et parasitologie	SIGALAS
Pathologie générale et expérimentale	SARIC
Clinique ophtalmologique	N.
Clinique chirurgicale infantile et orthopédie	POUYANNE
Clinique médicale et des maladies infectieuses	AUBERTIN
Chimie biologique et médicale	TAYEAU
Physique médicale et pharmaceutique	PIFFAULT
Médecine coloniale et Clinique des maladies exotiques	BONNIN
Clinique des maladies cutanées et syphilitiques	JOULIA
Clinique des maladies des voies urinaires	DARGET
Clinique des maladies nerveuses et mentales	DELMAS-MARSALET
Clinique d'oto-rhino-laryngologie	G. PORTMANN
Toxicologie et hygiène a. pnique	CASTAGNOU
Clinique odonto-stomatologique	DUBECQ
Botanique et cryptogamie	GIRARD
Thérapeutique	F.-J. TRAISSAC
Hydrologie thérapeutique et climatologie	DUBARRY

PROFESSEUR A TITRE PERSONNEL :

M. BLANQUET (Section Pharmacie)

PROFESSEURS SANS CHAIRE :

MM MAHON (Obstétrique), PAUTRIZEL (Parasitologie), Mlle ROUGIER (Physiologie), M. MOUSTARDIER (Bactériologie)

MAITRES DE CONFÉRENCES AGRÉGÉS :

	MM.
Anatomie pathologique	LÉGER
Anatomie	RIGAUD CABANIE
Biochimie médicale	NEUZIL
Pathologie expérimentale	FAURÉ
Physique médicale	DUHAMEL
Pharmacie (1re Section)	R. GOLSE ROMAIN
Pharmacie (2e Section)	MASQUELIER QUILICHINI
Pharmacie (3e Section)	CAZAUX

CHARGÉ DES FONCTIONS DE MAITRE DE CONFÉRENCES AGRÉGÉ :

M. STOLL (Histologie)

AGRÉGÉS EN EXERCICE :

	MM.
Médecine générale	BERGOUIGNAN LENG-LEVY MORETTI LAVIGNOLLE MARTIN-DUPONT DAVID-CHAUSSE J. RIVIÈRE
Chirurgie générale	LAUMONIER CHAVANNAZ VILLAR TINGAUD DÉPAULIS DARMAILLACQ
Obstétrique	CHASTRUSSE FAUGÈRE
Ophtalmologie	BESSIÈRE CORCELLE
Oto-rhino-laryngologie	DESPONS M. PORTMANN
Dermatologie et syphiligraphie	LE COULANT
Pédiatrie et puériculture	VERGER
Médecine légale et médecine du travail	L'EPÉE
Electro-radiologie	LACHAPELLE
Odonto-stomatologie	BENOIT
Urologi	LANGE
Neurologie et psychiatrie	BLANC
Pneumo-phtisiologie	FRÉOUR

COURS COMPLÉMENTAIRES :

	MM.
Médecine opératoire	LAUMONIER
Accouchements	CHASTRUSSE FAUGÈRE
Puériculture	VERGER PÉRY
Législation pharmaceutique	COUSTOU
Cryptogamie	LAUBIE
Obstétricie sociale	MAHON
Organographie et physiologie végétale	TEMPÈRE
Chimie biologique analytique	MARQUEVIELLE
Chimie analytique	BABIN
Pathologie chirurgicale	VILLAR CHAVANNAZ TINGAUD DARMAILLACQ LAPORTE
Zoologie pharmaceutique	BAILENGER
Physiologie	BENELLI
Toxicologie et Hygiène	Mlle LARCEBAU
Phytopharmacie	CORTESI
Droit médical international	AUBY
Médecine légale	L'EPÉE
Séméiologie médicale	LAVIGNOLLE
Séméiologie chirurgicale	DEPAULIS
Embryologie	STOLL
Pathologie médicale	BERGOUIGNAN LÉVY MORETTI DAVID-CHAUSSE RIVIÈRE MARTIN-DUPONT

Le Secrétaire principal de la Faculté : GAYRAUD

Par délibération du 5 août 1879, la Faculté a arrêté que les opinions émises dans les Thèses qui lui sont présentées doivent être considérées comme propres à leurs auteurs, et qu'elle entend ne leur donner ni approbation, ni improbation.

A MON PÈRE,

A MA MÈRE

En témoignage de filiale reconnaissance.

A MES BEAUX-PARENTS

A MES FRÈRES ET SŒURS

A MON MARI

A MON FILS

A MES ONCLES ET TANTES

A LA MÉMOIRE DE MON COUSIN
EUGÈNE PLANTIVEAU

A SA FAMILLE

A MADAME ET MADEMOISELLE DELSUC

A TOUS LES MIENS

A MADAME

ET

MONSIEUR LE PRÉSIDENT JEAN-RAYMOND GUYON

DÉPUTÉ DE LA GIRONDE

ANCIEN MINISTRE

OFFICIER DE LA LÉGION D'HONNEUR

CROIX DE GUERRE

OFFICIER D'ACADÉMIE

Hommage respectueux.

A MADAME LA SUPÉRIEURE ET AUX RELIGIEUSES
DU PENSIONNAT DE L'IMMACULÉE-CONCEPTION
DE CHANTENAY (LOIRE-INFÉRIEURE)

A NOTRE MAITRE DE STAGE :

MONSIEUR R. LAFAYE

DOCTEUR EN PHARMACIE

LICENCIÉ ÈS SCIENCES

Qui a guidé nos premiers pas dans la profession et dont nous avons conservé un excellent souvenir.

A MONSIEUR E. DROUET DE LA THIBAUDERIE

INSPECTEUR DIVISIONNAIRE DES PHARMACIES A NANCY

Qui nous a toujours manifesté beaucoup d'intérêt en nous encourageant au cours de nos études.
Témoignage de reconnaissance.

A MES CAMARADES DU CENTRE DE RECHERCHES
DE BIOLOGIE PRÉVENTIVE DE LA CAISSE RÉGIONALE
DE SÉCURITÉ SOCIALE DE BORDEAUX

A MES CAMARADES DU LABORATOIRE
DE CHIMIE BIOLOGIQUE ET MÉDICALE
DE LA FACULTÉ DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE
DE BORDEAUX

A NOS MAITRES DE L'ÉCOLE DE MÉDECINE
ET DE PHARMACIE DE POITIERS

A NOS MAITRES
DE LA FACULTÉ DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE
DE BORDEAUX

A MONSIEUR LE DOCTEUR NIVET

ASSISTANT DE CHIMIE BIOLOGIQUE

A LA FACULTÉ DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE DE BORDEAUX

A MONSIEUR J. MARQUEVIELLE

CHEF DE TRAVAUX PRATIQUES ET CHARGÉ DE COURS

A LA FACULTÉ DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE DE BORDEAUX

DOCTEUR ÈS SCIENCES

Qui, avec la plus grande amabilité, nous ont fait profiter de leurs conseils et nous ont aidée dans la réalisation de certaines expériences.

Témoignage de remerciement.

A NOS JUGES

MONSIEUR J. MASQUELIER

MAÎTRE DE CONFÉRENCES AGRÉGÉ DE PHARMACIE

DOCTEUR ÈS SCIENCES

Qui a dirigé une partie de nos recherches et dont les conseils amicaux nous ont toujours été très précieux.
Témoignage de reconnaissance.

MONSIEUR LE PROFESSEUR R. PAUTRIZEL

DOCTEUR ÈS SCIENCES

DIRECTEUR DU LABORATOIRE DÉPARTEMENTAL DE SÉROLOGIE

EXPERT DE L'ORGANISATION MONDIALE DE LA SANTÉ

CROIX DE GUERRE 1939-1945

OFFICIER D'ACADÉMIE

Dont la grande amabilité à notre égard ne s'est jamais démentie.
Nous sommes heureux de le compter parmi nos juges.

MONSIEUR LE PROFESSEUR G. VITTE

PROFESSEUR DE PHARMACIE

PHARMACIEN DES HÔPITAUX

MEMBRE CORRESPONDANT DE L'ACADÉMIE DE PHARMACIE

OFFICIER DE L'INSTRUCTION PUBLIQUE

CHEVALIER DE L'ORDRE DE LA SANTÉ PUBLIQUE

Dont nous conservons un souvenir très sympathique.
Hommage de respectueuse reconnaissance.

A NOTRE MAITRE ET PRÉSIDENT DE THÈSE

MONSIEUR LE PROFESSEUR F. TAYEAU

PROFESSEUR DE CHIMIE BIOLOGIQUE ET MÉDICALE

ASSESSEUR DU DOYEN

DOCTEUR ÈS SCIENCES

OFFICIER DE L'INSTRUCTION PUBLIQUE

MÉDAILLE D'HONNEUR DU SERVICE DE SANTÉ DE LA MARINE

Il nous a accueillie jeune élève dans son laboratoire, s'intéressant à nos études et sachant déjà nous montrer la grandeur et la servitude de la recherche scientifique.

Il a su rapidement nous compter parmi ses collaborateurs, nous communiquant son enthousiasme.

Près de lui nous avons souvent trouvé un appui sûr dans les difficultés. Ses conseils éclairés et ses compétences ne nous ont jamais été refusés.

Nous quittons avec peine un Maître qui a marqué en traits indélébiles notre vie scientifique.

Hommages respectueux et profondément reconnaissants.

RECHERCHES ANALYTIQUES ET BIOCHIMIQUES SUR LE CHROMOGÈNE LEUCO-ANTHOCYANIQUE DE LA GRAINE D'ARACHIDE (*Arachis hypogaea* L.)

AVANT-PROPOS

La science — et la biochimie en particulier — connaît un perpétuel renouvellement.

La profusion des recherches et l'apport de techniques nouvelles rendent caduques certaines données considérées, il y a peu de temps encore, comme classiques. Une tendance souvent fâcheuse fait table rase des travaux anciens pour ne considérer que les toutes récentes recherches, que l'épreuve du temps n'a pas encore passées au crible.

Lorsque l'on fouille les travaux anciens, on est parfois étonné de la qualité des observations, surtout si l'on tient compte du caractère rudimentaire des techniques utilisées; on s'aperçoit alors que les auteurs sont passés bien près de phénomènes découverts seulement beaucoup plus tard. Le D. D. T., dont les propriétés insecticides ont rendu les immenses services que l'on sait et qui ont valu le prix Nobel à leur auteur, avait été découvert il y a bien longtemps ! Les carotènes, dont les propriétés provitaminiques A constituent l'une des plus belles découvertes biochimiques, avaient été isolés et identifiés au début du siècle dernier !

Les substances vitaminiques P qui rentrent dans le cadre de notre travail peuvent justifier des mêmes remarques : lorsque Szent-Györgyi et Rusznyack mirent en évidence

l'effet exercé par la « citrine » sur la résistance vasculaire, ils furent amenés à attribuer cette propriété à l'hespéridoside, hétéroside contenu dans le citron; or, il y a bien longtemps que cette substance avait été découverte : c'est, en effet, en 1828 que Lebreton [38] l'avait isolée !

Cette découverte des propriétés vitaminiques P, appartenant à de nombreux dérivés flavoniques, a fait connaître à cette classe de dérivés, si bien étudiés par Robinson, un regain d'actualité et les travaux abordés par Lebreton, puis revivifiés par Szent-Györgyi, sont entrés dans une phase nouvelle.

Au cours de ses recherches nutritionnelles sur les protéines de la graine d'arachide, notre maître, M. le Professeur Tayeau, avait observé que les solutions extractives de ces protéines présentaient souvent une coloration rose virant au violet par alcalinisation. Cette coloration fut attribuée par la suite à la présence dans le tourteau d'arachide de parcelles provenant du tégument de la graine. A la suite de cette observation, Tayeau [2, 3] effectua des recherches sur les pigments de ce tégument et démontra qu'il s'agissait de substances apparentées aux anthocyanidols.

Quelques années plus tard, il reprit, avec son collaborateur Masquelier, l'étude de ces pigments, qui conduisit à l'isolement d'un leucocyanidol (Tayeau et Masquelier [93]) (*). Une flavanonne (Masquelier et Blanquet [53]), un tannoïde et un phlobaphène (Masquelier [49]) étaient mis également en évidence.

Le leucocyanidol, comme de nombreux dérivés flavoniques, présente des propriétés vitaminiques P (Tayeau et Masquelier [96]), tandis que le tannoïde se conduit comme l'antivitamine correspondante (Masquelier [51]).

Lorsque nous lui avons demandé un sujet de travail, M. le Professeur Tayeau nous proposa de parfaire l'étude

(*) Leucocyanidol, leuco-anthocyanidol, chromogène leuco-anthocyanique correspondent à la même substance.

du leucocyanidol de l'arachide, dont diverses propriétés chimiques et biologiques restaient à établir. Il inspira et dirigea nos recherches (deuxième partie) relatives à l'étude spectrographique (chapitre II), au dosage (chapitre III), au métabolisme (chapitre IV), à l'action sur l'hyaluronidase (chapitre V), sur l'estérification du cholestérol sérique (chapitre VI) et sur le sérum sanguin (chapitre X).

M. J. Masquelier, Maître de Conférences agrégé, qui avait, de son côté, réalisé de nouvelles recherches sur les flavones et notamment sur celles du pin maritime [58] (voir thèse Sansous [74]) et des vins [55, 56, 57] (voir thèse Jensen [28]), nous proposa de réaliser avec lui certaines études; c'est sous la direction de M. Masquelier que nous avons effectué nos recherches sur l'activité du leucocyanidol (chapitre premier), sur les ions cuivre (chapitre VII), sur l'acide ascorbique oxydase (chapitre VIII) et sur la tyrosinase (chapitre IX).

La première partie de notre travail consiste en un rappel de nos connaissances chimiques, biogénétiques et physiologiques sur le leucocyanidol.

La seconde partie comprend l'exposé de nos recherches expérimentales, dont le détail par chapitre est indiqué plus haut.

La plupart de nos recherches avaient été abordées dès 1949. Des événements indépendants de notre volonté nous ont obligée à quitter le laboratoire avant qu'elles soient menées à bien. Plus tard, en 1954, nous avons repris nos travaux et terminé le programme que notre maître nous avait assigné.

La question des dérivés flavoniques et des substances vitaminiques P revêt une telle actualité que de nombreuses écoles, tant françaises qu'étrangères, s'attachent à ce problème; aussi, certains résultats assez voisins des nôtres ont-ils été publiés avant que nous ayons eu le temps de terminer notre travail : c'est le cas, en particulier, pour notre étude spectrophotométrique et quelques-uns de nos

essais sur l'hyaluronidase. Nous avons pensé néanmoins que ces travaux méritaient d'être publiés.

*
**

Nous ne voudrions pas aborder notre exposé sans remercier tous ceux qui nous ont aidée à réaliser nos travaux.

M. le Docteur Nivet nous a beaucoup conseillée au cours de nos recherches électrophorétiques : grâce à l'étendue de ses connaissances et à la précision de sa technique, nous avons pu réaliser en un temps minimum des expériences parfois complexes.

MM. Marquevielle, chef de travaux, et Reiss, préparateur, nous ont souvent apporté leur aide précieuse, le premier en nous conseillant continuellement et utilement, le second en nous initiant à la technique spectrophotométrique.

Mlles M. Basset et D. Duhau, M. J. Grouillé, agents techniques, nous ont fait souvent profiter de leur habileté technique.

A tous, nous adressons nos vifs remerciements.

M. Masquelier, Maître de Conférences agrégé de microbiologie, a inspiré et dirigé nos travaux sur l'activité du leucocyanidol et sur son action vis-à-vis de l'acide ascorbique oxydase. Nous avons beaucoup profité des conseils éclairés qu'il nous a prodigués; nous sommes heureuse de lui adresser nos remerciements reconnaissants.

Nous sommes heureuse de pouvoir assurer de notre profonde gratitude notre maître et juge, M. le Professeur Tayeau, qui a dirigé si remarquablement nos recherches. Nous avons eu le plaisir de continuer, après M. Masquelier, un sujet qui, nous le savons, lui est cher puisqu'il est à l'origine des premières découvertes. Il nous a permis de faire progresser son œuvre, nous conseillant toujours avec bienveillance et mettant à notre service son entrain et sa haute intelligence.

PREMIÈRE PARTIE

RAPPEL DES TRAVAUX ANTÉRIEURS

CHAPITRE PREMIER

LE LEUCOCYANIDOL ET SON ANTAGONISTE, LE TANNOÏDE.

ÉTUDE CHIMIQUE

Nous avons signalé dans l'avant-propos comment, à la suite de circonstances fortuites, M. le Professeur Tayeau avait été amené à étudier les pigments de la graine d'arachide.

A cette époque (1941), notre maître effectua quelques essais préliminaires montrant que ces pigments étaient de nature flavonique; ce n'est que plus tard qu'il montra, en collaboration avec Masquelier, que le tégument contenait en réalité plusieurs pigments.

Fort peu de travaux avaient été réalisés sur ce sujet. Kryz [31], en 1922, avait simplement signalé l'existence de ces pigments et s'était borné, dans son travail, à mentionner quelques propriétés de solubilité. Un peu plus tard, G. et R. Robinson [68] effectuaient une étude sur les leuco-anthocyanes et, parmi les végétaux renfermant ces substances, ils signalaient l'arachide. On ne peut cependant rattacher la coloration intense du tégument à ces seuls leuco-anthocyanes; ces derniers sont, en effet, incolores ou à peine colorés. D'autres pigments existaient donc dans le tégument.

Après un certain nombre d'essais préliminaires, dont on trouvera la description par ailleurs [95, 48], Tayeau et Masquelier sont parvenus à décrire plusieurs techniques permettant de fractionner les pigments. Voici l'une d'elles :

Les pellicules, préalablement délipidées, puis « dépoussiérées », sont épuisées dans un appareil du type Soxhlet par de l'alcool à 95° bouillant et pendant trois heures. La solution alcoolique obtenue, filtrée, puis distillée sous vide, laisse un résidu rouge brun. Ce résidu contient en très faible quantité une fraction soluble dans l'éther et le chloroforme, identifiée ultérieurement comme étant une *flavannone*. Ce même résidu renferme un pigment insoluble dans l'eau, un *phlobaphène*. Une autre fraction de ce résidu est soluble dans l'eau; elle contient deux autres pigments séparables soit par chromatographie, soit à l'aide d'une solution saturée en chlorure de sodium : un *tannoïde* et un *chromogène*.

Bien des variantes peuvent être apportées à cette méthode : c'est ainsi que le chromogène et la flavannone peuvent aisément s'extraire de la totalité des pigments grâce à leur solubilité dans l'acide chlorhydrique à 1 p. 100, qui ne dissout ni le tannoïde, ni le phlobaphène. La flavannone sera facilement séparée grâce à sa solubilité particulière dans l'éther. Le chromogène, qui constitue alors le résidu de l'extraction éthérée, peut être facilement purifié.

Parmi ces divers pigments, seuls le chromogène et le tannoïde, son antagoniste (voir plus loin), retiendront notre attention.

Constitution chimique du chromogène

Le chromogène peut être purifié par passages successifs dans l'alcool amylique, dans l'acide chlorhydrique à 1 p. 100 et dans l'acétone, au sein de laquelle on l'insolubilise finalement à l'aide d'éther anhydre.

Le produit se présente sous l'aspect d'une poudre amorphe jaunâtre et de saveur amère; il est très soluble dans l'alcool et l'acétone, assez soluble dans l'eau et insoluble dans l'éther, le chloroforme et le benzène.

Abandonnée à l'air libre, la solution aqueuse du chromogène prend une coloration rouge qui s'accentue à la longue, tandis qu'apparaît un précipité de même couleur. Ces produits rouges, solubles et insolubles, ont été identifiés au tannoïde et au phlobaphène, également isolés de la plante.

Pour déterminer la structure du chromogène, Tayeau et Masquelier [95] ont mis en œuvre les techniques généralement utilisées pour préciser la constitution des pigments anthocyaniques. Voici résumées les conclusions auxquelles ces auteurs sont parvenus :

1° La fusion alcaline, effectuée selon la méthode de Bougault [11], a permis d'obtenir d'une part du phloroglucinol, d'autre part un mélange à parties égales d'acide protocatéchique et d'acide vanillique. Ce résultat confirme la similitude de structure entre le chromogène et les pigments anthocyaniques.

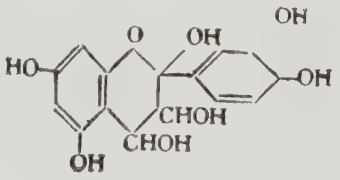
2° L'eau oxygénée possède la propriété de scinder la molécule des anthocyanes au niveau de l'hétérocycle. Pour les déterminations de structure, cette réaction s'est montrée parfois préférable à l'hydrolyse barytique (Karrer [29]), sauf toutefois lorsque le noyau phénolique latéral renferme des hydroxyles en position ortho; dans ce dernier cas, l'eau oxygénée détruit complètement la molécule, ne laissant rien subsister des dérivés du pyrocatéchol. En suivant la technique de Scott-Moncrieff [76], les auteurs ont constaté que l'eau oxygénée détruisait la molécule du chromogène. Ce résultat confirme le précédent : le cycle latéral possède deux oxhydriles en position ortho.

3° La réaction de Blaschko [10], mettant en jeu le molybdate d'ammonium en milieu chlorhydrique (changement de coloration), permet de savoir si l'un de ces deux

hydroxyles se trouve méthoxylé; dans ce cas, la réaction se montre négative. Avec le chromogène de l'arachide, on obtient une réaction positive, ce qui permet de conclure que cette substance existe, au moins en partie, sous la forme non méthoxylée (*).

4° Voulant préciser la constitution de ce chromogène, les auteurs ont effectué des dosages de carbone, d'hydrogène et de groupements méthoxy, qui ont donné les résultats suivants : C, 56 p. 100; H, 4,54 p. 100; OCH_3, 4,43 p. 100.

5° Enfin, la facile transformation du chromogène en cyanidol, rattachée à une déshydratation, conduit Tayeau et Masquelier à admettre, en accord avec Robinson [68], l'existence du groupement — CHOH — CHOH— en position 3-4 dans le cycle pyranique. En conséquence, la formule suivante, qui cadre bien avec les teneurs en carbone et en hydrogène et qui se montre en parfait accord avec les données classiques de Robinson, a été attribuée au chromogène.



Chromogène

Le taux des groupements — OCH_3, inférieur de moitié aux chiffres théoriques, s'explique fort bien si l'on admet que le chromogène existe en parties égales sous la forme libre et sous la forme méthoxylée.

Signalons qu'à la suite de tout récents travaux (voir 19), la position d'un oxydryle en 2 a été mise en doute; de plus, il est admis que le passage du leuco-anthocyane

(*) Selon Karrer [29], on rencontre très souvent dans les plantes renfermant des pigments anthocyaniques des mélanges de dérivés méthoxylés et non méthoxylés.

au cyanidol correspond en réalité à une déshydratation oxydante.

Il serait intéressant de reprendre des recherches sur ce point.

Constitution chimique du tannoïde

Cette substance, étudiée par Masquelier [50], est la plus abondante parmi les divers pigments (15 p. 100) des pellicules délipidées. Elle se présente sous l'aspect d'une poudre amorphe, rouge brun, de saveur astringente. Sa solution aqueuse, rouge vif, fonce par alcalinisation.

Cette substance présente les caractères suivants :

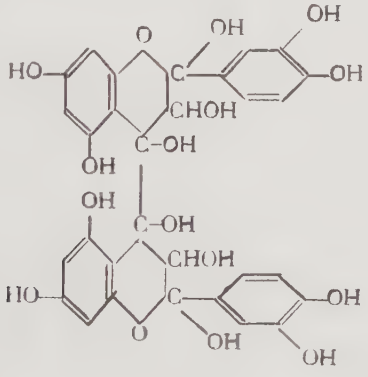
a) Par ébullition en milieu acide dilué, elle se transforme en un produit rouge insoluble, aisément identifiable à un phlobaphène;

b) Par distillation sèche, elle produit du pyrocatéchol;

c) Par fusion alcaline, elle donne naissance à de l'acide protocatéchique et à du phloroglucinol.

Le produit s'identifie absolument avec celui qui s'insolubilise à la longue au sein d'une solution de leucocyanidol abandonnée à l'air libre.

Se basant alors sur les travaux de Russel et Todd [72], qui sont parvenus à préparer par synthèse des produits



Tannoïde

en tous points comparables aux tannoïdes des catéchiques naturels, Masquelier [50] admet pour le tannoïde la formule ci-dessus, qui explique sa formation à partir du chromogène.

Les deux autres pigments, que nous n'avons pas étudiés dans notre travail, ont fait l'objet de recherches de Masquelier et Blanquet pour la flavannone [54] et de Masquelier [50] pour le phlobaphène.

CHAPITRE II

LOCALISATION DES PIGMENTS ET BIOGENÈSE

Il était intéressant de savoir si les divers pigments contenus dans le tégument de l'arachide présentaient entre eux une certaine parenté et s'ils se trouvaient répartis dans les diverses assises cellulaires du tégument.

Rappelons que ce dernier comporte du dehors en dedans :

a) Un épiderme, constitué par une seule assise de cellules à parois cutinisées;

b) Un parenchyme à faisceaux libéro-ligneux, comprenant lui-même deux couches, externe (à cellules polygonales) et interne (à cellules aplaties terminées par une assise scléreuse) ;

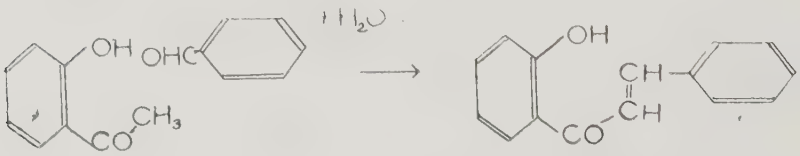
c) Enfin, une couche hyaline constituée d'une seule assise de cellules polygonales.

L'étude cytochimique réalisée par Tayeau et Masquelier [94], mettant en œuvre diverses réactions (réaction de Stiasny, réaction au bichromate), a montré que le chromogène leuco-anthocyanique est situé dans les cellules de l'assise la plus externe du tégument, tandis que la flavannone se trouve, au contraire, dans l'assise la plus interne. Cette constatation amène les auteurs à penser que la flavannone, présente dans la plante à l'état de traces, serait rapidement transformée en hydroxy-4-flavanne par un

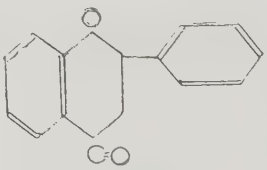
processus de réduction du type envisagé par Zanoni [108] ; l'hydroxy-4-flavanne s'oxyderait ensuite pour former le leuco-anthocyane, oxydé ultérieurement en tannoïde, qui, polymérisé, conduirait au phlobaphène. Ces transformations seraient conditionnées par des enzymes [6], probablement à base de cuivre [104] ; l'influence possible de la température [25] et de la composition des sols [103] expliquerait la différence de composition quantitative entre les échantillons étudiés.

Si cette observation nous renseigne sur la filiation possible des divers pigments, elle ne nous apporte pas de données sur leur biogenèse. Selon les anciennes conceptions, des glucides [20], des acides organiques [60], des substances azotées même [75] pourraient être la base des pigments flavoniques. Cette question a bénéficié depuis quelques années de très importants travaux.

En 1942, Reichel et Schickle [67] montraient que la condensation d'une cétone avec un aldéhyde aromatique, substances répandues chez les végétaux, conduisait à des chalcones, précurseurs éventuels de flavones et d'anthocyanes.

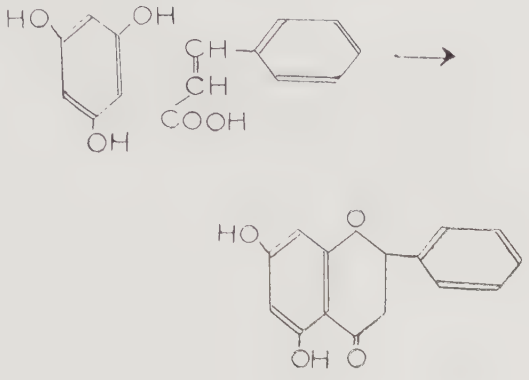


(chalcone)



(flavannone)

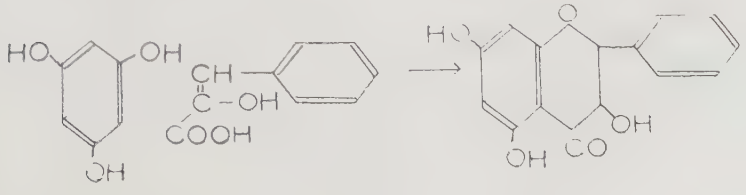
Plus tard, Mentzer [59] échafaudait une hypothèse et suggérait la condensation d'unités structurales en C_6-C_3, si répandues dans la nature, avec un di- ou un polyphénol; ainsi les auteurs expliquent la biogenèse de la pinocembrine par combinaison du phloroglucinol avec l'acide cinnamique et montrent sa réalisation aisée *in vitro*.



(pinocembrine)

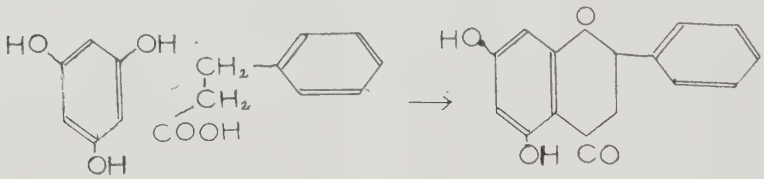
Ces conceptions allaient trouver un solide argument dans les travaux de Mœvus et collaborateurs [9]. Opérant sur un mutant de *Clamydomonas eugametos*, ces auteurs prouvaient que l'acide di-hydroxy-3-4-cinnamique devait être considéré comme le précurseur du quercétol. Si l'intervention du phloroglucinol, dans cette synthèse, n'est pas encore prouvée, il faut néanmoins admettre l'existence d'un corps très voisin ou bien d'un précurseur susceptible au moment voulu de se transformer en ce triphénol.

Il est d'ailleurs probable que les acides phénylpyruviques, provenant de la phénylalanine coucourent à la biogenèse de dérivés flavoniques. La réaction, selon Mentzer [59] pourrait s'écrire ainsi :



Il est fort probable que les progrès considérables dus en grande partie à la chromatographie de partage sur papier pourront nous renseigner d'ici peu de temps sur la présence des divers précurseurs des flavones au cours de la croissance des végétaux (*).

En ce qui concerne l'arachide, nous pouvons, à la lumière des conceptions précédemment exposées, formuler une hypothèse. Nous pouvons supposer que les précurseurs de la flavannone, qui semble constituer, selon Tayeau et Masquelier, le premier pigment formé, seraient le phloroglucinol, souvent rencontré chez les végétaux et l'acide phénylpropionique; ce dernier dérivé se forme aisément par désamination réductrice de la phénylalanine si abondante dans l'arachide (voir 46). La réaction serait donc la suivante :



Une oxydation ultérieure transformerait alors la flavannone ainsi formée en celle rencontrée dans l'arachide.

Ce ne sont là que des hypothèses dont le seul mérite, à nos yeux, est de susciter des recherches nouvelles.

(*) On lira avec intérêt le rapport présenté par le Professeur Génevois au Congrès des fruits et légumes (Paris, septembre 1955).

CHAPITRE III

PROPRIÉTÉS BIOLOGIQUES DU CHROMOGÈNE LEUCO-ANTHOCYANIQUE

Le chromogène leuco-anthocyanique de l'arachide présente, par sa structure, une incontestable parenté avec les substances vitaminiques P précédemment décrites.

Rappelons rapidement l'essentiel des recherches effectuées sur ces substances.

C'est en 1936 que Szent-Györgyi et ses collaborateurs [3] mettaient en évidence le pouvoir que possèdent les extraits de citron et le paprika d'augmenter la résistance capillaire chez l'Homme. Les mêmes auteurs [2] démontraient peu après que cette propriété devait être rattachée à la présence dans ces fruits d'*hespéridoside*, hétéroside découvert cent ans plus tôt [38]. Par la suite, ce pouvoir était également attribué à l'*éryodictyoside*, puis au *quercétol* [85].

Il résultait de ces découvertes que les phénomènes hémorragiques du scorbut n'étaient probablement pas dus à une carence exclusive en vitamine C, mais à la carence en un autre facteur, fait déjà soupçonné d'ailleurs quelques années auparavant [73, 8]. La naissance de ce nouveau facteur, désigné sous le nom de vitamine P, suscita de multiples controverses et « Szent-Györgyi, qui, suivant sa propre expression humoristique, était devenu sans le savoir

le père de la vitamine C, se vit cette fois refuser la nouvelle paternité à laquelle il aspirait » (*).

Divers composés chimiques, tous de structure flavonique, ont été rattachés au groupe des vitamines P.

Ces diverses vitamines se rencontrent dans le citron, le paprika, l'orange, la tomate, les épinards, le vin rouge, etc.

Mode d'action. — Le mode d'action de ces substances reste encore inconnu. Cependant, Lavollay [34], dès 1941, a émis une hypothèse sur cette action : selon cet auteur, la vitamine P inhiberait *in vivo* l'oxydation de l'adrénaline, dont l'une des fonctions serait précisément de régler le tonus des vaisseaux capillaires; en l'absence de vitamine P, l'adrénaline serait rapidement oxydée dans l'organisme, et la résistance capillaire se trouverait considérablement diminuée. Cette hypothèse se trouve étayée par le fait que les vitamines P possèdent la propriété d'inhiber l'autoxydation de l'adrénaline; elles inhibent, en outre, l'autoxydation de la vitamine C.

Les vitamines P ne présentent pas une spécificité bien étroite : l'acide ascorbique s'avère capable, lui aussi, de faire régresser certains troubles de la résistance capillaire.

D'après les récentes recherches de Lavollay et collaborateurs [78], l'acide ascorbique suffirait à maintenir normal le taux de la résistance vasculaire; aussi, ces auteurs, se refusant à considérer les substances P comme de véritables vitamines, mettent-ils en doute le concept de vitamine P.

Les recherches réalisées par Lecoq [39] montrent qu'il ne convient pas d'être trop absolu dans ce domaine. Cet auteur considère que les conclusions de Lavollay ne sont valables que pour des conditions expérimentales bien déterminées. Il fait remarquer à ce propos que les troubles de la résistance capillaire, généralement associés à la carence en facteur P, peuvent dans certains cas être rattachés à d'autres causes et en particulier à des troubles nutritifs (**)

(*) Cité par Boulanger [12].

(**) Signalons, en particulier, le rôle joué par un régime déficient en acides gras [30].

ou bien à des dysendocrinies. A l'appui de cette remarque, Lecoq rappelle qu'il est parvenu jadis, en collaboration avec Mme Randoin [66], à réaliser un syndrome de polynévrite aviaire à la suite d'un régime déséquilibré au point de vue glucides, syndrome sur lequel la thiamine et même le complexe B se montraient sans effet; on ne saurait cependant nier le rôle de la vitamine B_1 dans la régression de la polynévrite aviaire ! L'administration du facteur manquant chez l'animal carencé ne peut donc se montrer efficace que si des troubles complémentaires ne viennent pas se surajouter à l'état de carence.

Cette remarque formulée, Lecoq fait appel à ses travaux, réalisés avec Chauchard et Mme Mazoué [41], qui lui ont permis de mettre au point un régime à base de farine et de son de blé (*) amenant chez le Rat et le Cobaye une avitaminose P vraie (**). Cette avitaminose se caractérise par de la fragilité vasculaire, qui n'est pas due ici à l'avitaminose C (les animaux recevant quotidiennement une dose suffisante d'acide ascorbique) et par des troubles nerveux [42], caractérisés par une atteinte des centres encéphaliques supérieurs, dont les manifestations chronaximétriques sont opposées à celles du scorbut [40]. Or, seuls les facteurs vitaminiques P corrigent, avec la résistance capillaire abaissée, les symptômes nerveux.

Il résulte de ces observations que seules doivent être considérées comme des vitamines P les substances qui se montrent capables de faire régresser d'une façon durable tous les symptômes de l'avitaminose P (***) et, en particu-

(*) Le régime comprend, en outre, de l'huile de foie de morue, du chlorure de sodium et du lactate de calcium, le tout complété par de la vitamine C (5 mg par jour chez le Rat, 10 mg chez le Cobaye).

(**) L'existence d'une carence en facteur P chez le Cobaye avait été soutenue auparavant [13].

(***) Il est intéressant, au sujet des conclusions de Lecoq, de rappeler ce qu'écrivaient Géro et Galmiche [26] en 1946 : « Il est évident qu'une discrimination est nécessaire, car si l'effet sur la résistance capillaire constitue un indice de l'activité vitaminique P, il n'est pas dit que tout corps exerçant à un degré plus ou moins grand cet effet puisse être désigné comme une vitamine P. D'autres arguments sont nécessaires pour conclure, en attendant que l'étude précise de l'avitaminose P expérimentale puisse trancher plus directement la question ».

lier, la fragilité vasculaire, les troubles nerveux et l'état d'acidose, caractéristiques de cette carence (*). L'acide ascorbique et l'esculoside [43], dont l'effet ne se manifeste que sur la perméabilité vasculaire, ne sauraient être classés parmi les vitamines P.

Les travaux de Lecoq et de ses collaborateurs ont donc permis, tout en le limitant, de renforcer le concept de la vitamine P [39].

Le leucocyanidol de l'arachide allait-il être reconnu comme une substance vitaminique P ?

Il en est bien ainsi : Tayeau et Masquelier [96] ont, en effet, montré que le leucocyanidol de l'arachide exerce une action très efficace sur la résistance vasculaire; une injection au cobaye de 0,25 mg de chromogène suffit à doubler le taux de la résistance vasculaire.

Par ailleurs, Lecoq, Chauchard et Mazoué [43] ont pu montrer que le leucocyanidol répond parfaitement aux caractères des substances vitaminiques P : le leucocyanidol renforce la résistance vasculaire, il corrige les symptômes nerveux résultant de la carence en vitamine P; il présente enfin des propriétés alcalosiques.

Signalons encore que le leuco-anthocyane de l'arachide présente des propriétés anti-anaphylactiques (Pautrizel, Pautrizel-Bézian et Tayeau). Nous aurons l'occasion de revenir sur ce point dans la partie expérimentale de notre travail.

(*) Il convient encore d'ajouter que ces substances se montrent actives *per os* [63], qualité nécessaire pour justifier le nom de vitamine.

DEUXIÈME PARTIE

ÉTUDE EXPÉRIMENTALE

CHAPITRE PREMIER

LE LEUCOCYANIDOL ET LES SUBSTANCES VITAMINIQUES P

Le nombre de substances vitaminiques P est extrêmement grand et il s'accroît de jour en jour. Dans une récente revue de Tayeau [89], on trouvera des renseignements sur les divers types de substances naturelles manifestant une certaine activité sur la résistance vasculaire.

D'âpres discussions ont eu lieu en ce qui concerne l'activité biologique de ces diverses substances; cela se conçoit quand on sait les difficultés que l'on éprouve lorsqu'il s'agit de mettre au point une méthode rigoureuse pour la mesure de la résistance vasculaire; les résultats obtenus varient, en effet, avec la technique mise en jeu.

Nous ne croyons pas superflu de rappeler la technique utilisée pour la mesure de la résistance vasculaire. La méthode consiste à mesurer chez l'animal (Cobaye), après un temps donné, l'augmentation de la résistance capillaire produite par l'injection d'une certaine quantité de vitamine P (*). La technique de mesure de la résistance capillaire met en jeu une petite ventouse que l'on applique sur la peau et dans laquelle on fait un vide dont on apprécie

(*) Le terme « vasculaire » est plus exact que « capillaire » [35]. Le second est cependant consacré par l'usage. Nous utiliserons aussi bien l'un que l'autre.

l'intensité à l'aide d'un manomètre. On mesure alors la plus petite dépression nécessaire pour obtenir l'apparition de pétéchies (points hémorragiques), lorsque l'action a été maintenue pendant une minute (Parrot et Galmiche [62]).

La figure 1 représente le schéma de l'appareil que nous utilisons : il comporte donc une petite ventouse (diamètre : 1 cm) reliée par un tube de caoutchouc à une trompe à

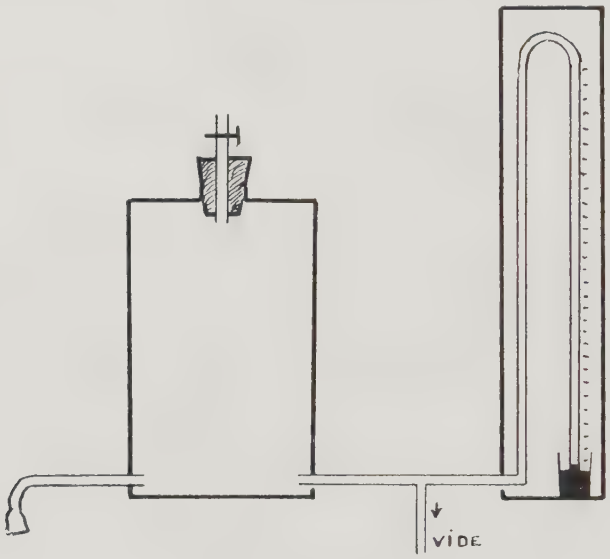


Fig. 1.

vide. Sur le trajet du tube se trouvent interposés un grand récipient (amortissement des écarts éventuels de pression) et un manomètre à mercure. Le récipient possède un dispositif d'admission d'air permettant de régler la dépression sans agir sur la trompe à vide. L'animal de choix, pour ce genre de mesure, est le Cobaye. La technique nécessite un certain nombre de précautions essentielles (*).

En premier lieu, il ne faut pas tenir compte des pétéchies apparaissant à la périphérie de la région déprimée; seules devront être notées les deux ou trois premières pétéchies

(*) D'après Masquelier [48].

qui se produisent au centre de cette région. Lorsque la mesure de la résistance vasculaire n'a pu se faire au premier essai, on recommence l'opération dans une région aussi voisine que possible, après avoir laissé le cobaye au repos pendant quinze à vingt minutes. Le cobaye réagit au froid par une augmentation de sa résistance capillaire [5] : il faut donc opérer sur des animaux ayant séjourné au moins deux heures à la température du laboratoire.

Certains auteurs [107] préfèrent utiliser un dépilatoire pour mettre à nu l'épiderme du cobaye; on obtient d'aussi bons résultats en rasant avec précaution la région intéressée; de toute façon, ces opérations doivent être suivies d'un repos assez prolongé (une nuit paraît suffisante), car l'irritation locale qu'elles engendrent pourrait modifier la résistance capillaire de l'animal.

Il sera également opportun, comme le conseillent Lecoq, Chauchard et Mazoué, de soumettre préalablement les animaux à un régime approprié.

Nous nous sommes demandée alors si le leucocyanidol de l'arachide, dont la nette activité sur la résistance vasculaire avait été établie par Tayeau et Masquelier, était aussi actif que les autres substances vitaminiques P.

Des recherches bibliographiques nous laissaient déjà supposer que le leuco-anthocyane se montrait parmi les plus actifs :

1° Dès 1943, Sevin [79] avait effectué une étude comparative des diverses substances vitaminiques P connues jusqu'alors. Cet auteur opérait sur des cobayes : avant l'injection de 1 mg de substance à étudier, il mesurait la résistance capillaire; il la mesurait de nouveau vingt-quatre heures après l'injection. Voici le pourcentage d'augmentation constaté par Sevin :

Hespéridoside ..... de — 50 à 10 p. 100
Eryodictyoside ..... 20 —

Lutéoloside	31 p. 100
Rutoside	53
Quercitoside	34 —
Rhamnétoside	57 —
Quercitol	56 —
Rhamnétol	40
Morinol	20 —

2° Or, en opérant exactement dans les mêmes conditions, Tayeau et Masquelier avaient constaté [96], avec le leuco-anthocyane de l'arachide, une augmentation variant entre 60 et 90 p. 100.

Il nous a paru intéressant de vérifier l'exactitude de cette dernière constatation. Pour cela, nous avons effectué sur le cobaye une série de mesures mettant en jeu le leuco-anthocyane de l'arachide et deux « vitamines P », souvent utilisées en thérapeutique, l'esculoside et le rutoside (étudié par Sevin).

Nos essais ont porté sur des cobayes, dont nous avons mesuré la résistance capillaire avant et vingt-quatre heures après l'injection de 1 mg de produit.

Le tableau I consigne, en centimètres de mercure, les résultats que nous avons obtenus.

TABLEAU I

Vitamine P	Cobayes numéro	Résistance capillaire initiale	Résistance capillaire 24 heures plus tard	Augmentation constatée	Pourcentage d'augmentation
Rutoside	4	25	32	7	28
—	5	26	33	7	26
—	6	28	30	2	7
Esculoside	2	25	40	15	60
.....	3	26	33,5	7,5	28
Leuco-anthocyane.	7	25	51	26	104
— .	8	24	48	24	100
.	10	11	22	11	100

Il ressort nettement de ces résultats que le leuco-anthocyane de la graine d'arachide se montre certainement l'une des substances vitaminiques P les plus actives dans le maintien de la résistance capillaire.

Connaissant la structure de ces diverses substances, peut-on établir une relation entre leur constitution et leur activité ? Existe-t-il des groupements fonctionnels particulièrement responsables de l'activité ?

Certains auteurs [17] ont insisté sur la répartition des oxhydriles dans la molécule. Ce point de vue a été infirmé par Lavollay [33], qui a démontré que l'activité physiologique était liée en réalité à l'existence d'un oxhydrile en position ortho par rapport à une chaîne latérale. A l'appui de cette assertion, il constate qu'un certain nombre de dérivés répondant à cette condition présentent effectivement une activité sur la résistance vasculaire : c'est ainsi que la vitamine E, par exemple, se montre active [32].

Conclusions du chapitre premier

Le chromogène leuco-anthocyanique de l'arachide constitue l'une des substances connues les plus actives sur la résistance vasculaire.

CHAPITRE II

ÉTUDE SPECTROPHOTOMÉTRIQUE DU LEUCOCYANIDOL

Au cours des dix dernières années, la spectrophotométrie s'est développée d'une façon prodigieuse. Elle a permis de résoudre des problèmes qui, sans elle, seraient restés en suspens : qu'il nous suffise de rappeler le rôle qu'elle a joué dans la structure de la pénicilline et, tout récemment encore, pour l'établissement de la formule de la vitamine B_{12}.

Les dérivés flavoniques ont bénéficié aussi de cette technique : on s'en rendra compte aisément en lisant le compte rendu du colloque international des hétérocycles oxygénés qui a tenu ses assises à Lyon en septembre 1955; on verra que de nombreux problèmes concernant la structure de flavones diverses ont ainsi été résolus.

Nous avons réalisé le spectre du leucocyanidol de l'arachide grâce au spectrophotomètre de Beckman. Nous ne mentionnerons pas les chiffres obtenus au cours de nos mesures, les valeurs se retrouvant aisément sur les courbes ci-après, l'une correspondant à 50 γ par cm^3, l'autre à 100 γ (fig. 2). Minimum d'absorption : 275 $m\mu$.

Alors que nos mesures étaient déjà réalisées, Stanbury, Field et Guthrie [82] effectuaient de leur côté une étude spectrophotométrique des pigments de l'arachide. La courbe obtenue par ces auteurs est très voisine de la nôtre; la légère différence observée est due au solvant mis en

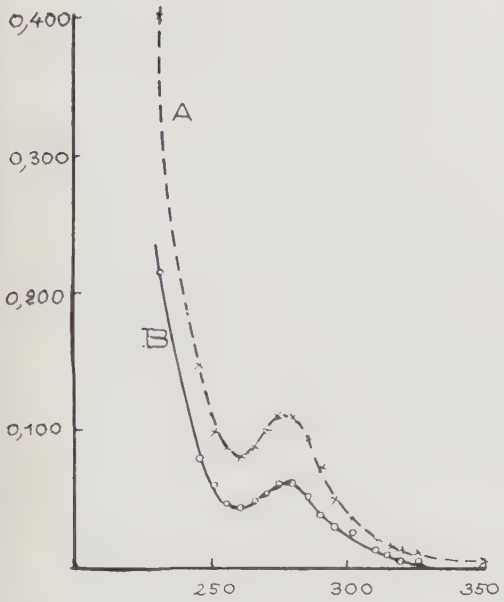


Fig. 2.

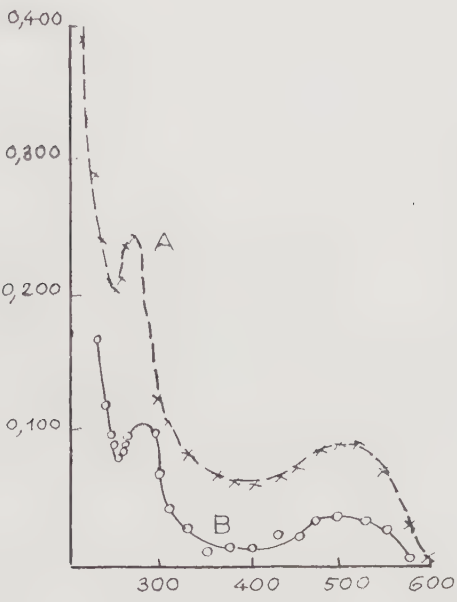


Fig. 3.

œuvre : les auteurs américains utilisent l'alcool, tandis que nous avons opéré avec des solutions aqueuses; or, on sait le rôle important que joue le solvant dans l'établissement d'une courbe spectrophotométrique (voir [19]).

Au cours de divers essais, nous avons eu l'occasion d'exposer la facile transformation du leucocyanidol en cyanidol (par chauffage en milieu chlorhydrique); nous avons également déterminé la courbe spectrophotométrique du cyanidol (fig. 3).

Cette dernière courbe est légèrement différente de celle du leucocyanidol et présente toutes les caractéristiques de cette série de dérivés.

Conclusions du chapitre II

Nous avons établi les courbes spectrophotométriques du leucocyanidol et du cyanidol.

CHAPITRE III

MISE AU POINT D'UNE TECHNIQUE DE DOSAGE PHYSICO-CHIMIQUE DU CHROMOGÈNE LEUCO-ANTHOCYANIQUE

Nous avons décrit, dans le chapitre précédent, la technique de dosage biologique des substances vitaminiques P. Cette technique, nous l'avons vu, est de réalisation extrêmement délicate; en outre, elle nécessite un matériel animal dont le prix atteint des chiffres élevés.

Si la technique biologique reste une technique de contrôle utile pour les besoins pharmacodynamiques, elle pourrait dans bien des cas être remplacée par une technique chimique, de réalisation plus rapide.

Pour cette raison, nous avons cherché à mettre au point une technique de dosage physico-chimique.

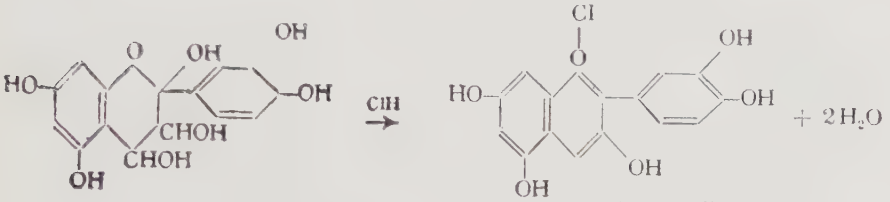
Au cours de nos premiers essais, nous dosions le produit pondéralement, mais nous avons dû abandonner cette technique, car la substance s'avère difficile à dessécher et s'altère rapidement au contact de l'air [48].

Le chromogène présente en solution une très légère coloration jaune paille, qui ne saurait être utilisée pour le dosage, en raison de sa faible intensité.

Nous avons donc cherché à transformer la substance en une matière colorante susceptible de permettre un dosage colorimétrique.

Nous avions tout d'abord pensé mettre en pratique la transformation oxydative du chromogène en tannoïde : le tannoïde formé présente, en effet, une belle coloration rouge foncé. Malheureusement, cette coloration se montre très instable et rapidement le tannoïde se polymérise pour se transformer en phlobaphène, qui précipite [48].

Nous avons alors envisagé une nouvelle éventualité, la transformation du chromogène en cyanidol. Lorsqu'en effet, une solution du chromogène, additionnée d'acide chlorhydrique (10 p. 100), est portée à l'ébullition, il apparaît une coloration rose devenant rapidement rouge cerise. Nous avons pu montrer que cette coloration était due à la formation de cyanidol (Tayeau et Masquelier [95]).



Chromogène (cyanidol)

Nous avons cherché à utiliser la formation de ce cyanidol pour doser colorimétriquement le chromogène leuco-anthocyanique.

Nous avons effectué un certain nombre d'essais préliminaires dans le but de préciser les conditions optima de transformation du chromogène en cyanidol.

Dans une première série d'essais, nous avons montré que, pour obtenir une coloration maximum et relativement stable, il fallait ajouter à la solution du chromogène un volume presque égal d'acide chlorhydrique concentré. Nous avons ensuite démontré que la coloration maximum était obtenue après un temps minimum de chauffage de quarante-cinq minutes au bain-marie à 100°. Enfin, ayant noté au cours du refroidissement l'apparition d'un trouble dans

le milieu, nous avons remédié à cet inconvénient en ajoutant, après le chauffage, une petite quantité d'alcool qui assure la limpidité parfaite du liquide.

Etablissement de la courbe étalon

Nous avons utilisé l'électrophotomètre de Meunier, fonctionnant en lumière verte (5.700 Å), avec une cuve de 0,5 cm d'épaisseur et une ouverture de diaphragme réglée à dix divisions.

Technique. — On prépare extemporanément une solution du chromogène dans l'eau distillée, telle que 1 cm³ renferme 0,1 mg du produit.

On réalise ensuite les différents mélanges indiqués au tableau, dans des tubes à essais Pyrex que l'on coiffe d'une ampoule remplie d'eau jouant le rôle de réfrigérant. On agite chaque tube et l'on porte les mélanges au bain-marie bouillant pendant quarante-cinq minutes. On refroidit pendant dix minutes dans l'eau courante, on enlève les ampoules ayant servi de réfrigérants, et l'on ajoute dans chaque tube 1 cm³ d'alcool à 90°. On agite doucement en évitant la formation de bulles d'air, et l'on porte à l'électrophotomètre. Le contenu du tube n° 1 sert de témoin pour la mise au zéro de l'appareil. La coloration demeure stable pendant trente minutes environ.

Résultats. — Le tableau II indique, pour chaque mélange que nous avons effectué, les divisions du tambour de l'électrophotomètre. A ce tableau correspond la courbe de la figure 4, qui fait office de courbe étalon.

A condition d'opérer sur des solutions renfermant de 50 à 300 γ de chromogène par cm³, nous avons constaté un parallélisme parfait entre le dosage électrophotométrique et l'activité pharmacodynamique du produit. A des concentrations plus élevées en chromogène, la courbe étalon n'est utilisable qu'après dilution du produit opérée par tâtonne-

ments, de façon à se placer dans la zone optimum précitée (*).

Afin de rendre plus rigoureuse encore la technique de dosage, nous avons établi le spectre du chromogène leuco-anthocyanique (voir p. 29) afin d'établir la zone correspondant au minimum d'absorption.

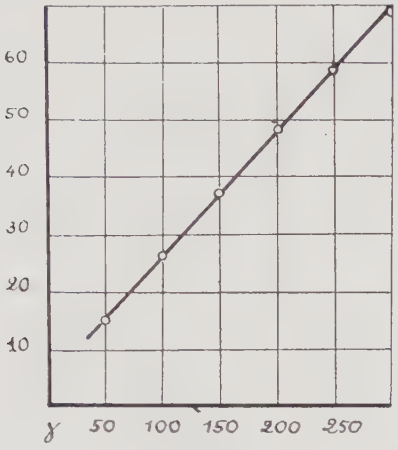


Fig. 4.

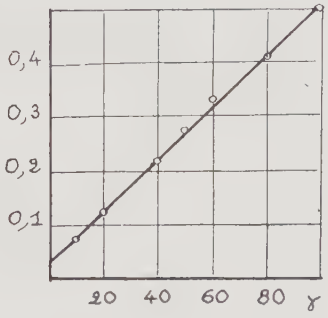


Fig. 5.

TABLEAU II

Mélanges n°	1	2	3	4	5	6	7
Solution du chromogène à 0,1 mg par cm³ (en cm³)	0	0,5	1	1,5	2	2,5	3
Acide chlorhydrique pur (cm³)	3	3	3	3	3	3	3
Eau distillée (en cm³)	3	2,5	2	1,5	1	0,5	0
Alcool à 90° (cm³)	1	1	1	1	1	1	1
Divisions du tambour de l'électrophotomètre de Meunier	0	15	26,5	37	48	58,5	68,5

(*) Quelque temps après notre publication sur ce sujet [97], Stansbury et Hoffpaur [83] ont décrit une technique très voisine de la nôtre permettant d'évaluer la présence de pellicules d'arachide dans le tourteau. La présence de ces pellicules diminue la valeur commerciale du tourteau (voir aussi 21).

Si donc on dispose d'un spectrophotomètre, on peut opérer ainsi à 275 mμ. La technique permet de doser des quantités de leucocyanidol de l'ordre de 20 γ par cm^3.

Voici la courbe étalon obtenue pour cette longueur d'onde (fig. 5).

Alors que nos recherches sur ce dosage avaient été publiées, Masquelier et Sansous [58] ont décrit de nouvelles techniques qu'ils ont appliquées au dosage du leucoanthocyanidol de *Pinus maritima*. Ces techniques mettent en œuvre le pouvoir réducteur du chromogène; dans la première, le dosage est réalisé à l'aide de la liqueur cuproalcaline; dans la seconde, à l'aide du permanganate. Les auteurs obtiennent avec ces techniques des résultats très précis.

Conclusions du chapitre III

Nous avons mis au point un procédé de dosage électrophotométrique du chromogène leuco-anthocyanique extrait du tégument de la graine d'arachide. La technique consiste à transformer cette substance en cyanidol, dont on mesure l'intensité de la coloration.

CHAPITRE IV

RECHERCHES SUR LE MÉTABOLISME DU LEUCOCYANIDOL

Les études effectuées sur le métabolisme des dérivés flavoniques sont nombreuses, mais elles apportent bien peu de faits précis. Cela doit être rattaché aux difficultés que présente le dosage des dérivés flavoniques, aux transformations inconnues qu'ils subissent dans l'organisme et surtout à l'animal utilisé pour les expériences.

Cette dernière remarque semble particulièrement importante. Nous avons effectué toute une série d'essais chez le Lapin : ces essais avaient consisté à administrer à cet animal des pigments de l'arachide et à les rechercher dans l'urine et les fèces. Nos résultats s'étaient montrés négatifs.

Par la suite, nous avons réalisé des expériences chez le Rat : avec cet animal, des pigments étaient aisément retrouvés dans les fèces et dans l'urine.

Un très important travail, riche en références, a fait l'objet d'un rapport au Conseil de la chimie et de la pharmacie aux U. S. A.; ce rapport, de Clark et Mc Kay traite de l'absorption et de l'excrétion du rutoside et de substances flavoniques diverses [18]; le lecteur s'y reportera avec fruit : il y trouvera une étude extrêmement fouillée sur la question.

Nos essais sur le leucocyanidol de l'arachide sont beaucoup plus modestes : ils consistent à étudier l'état sous lequel se trouve le leucocyanidol dans le sang.

A la suite des travaux de Wawra et Webb [106] qui ont isolé de l'épicarpe du citron un complexe formé d'une protéine et de la chalcone de l'hespéridoside, nous nous sommes demandée si, dans le sang, les vitamines P ne se trouveraient pas à l'état de complexes protéidiques. Nous avons réalisé des essais *in vitro* qui ont consité à ajouter du leucocyanidol à du sérum sanguin et à rechercher sous quel état, après un certain temps de contact, se trouvait le pigment.

Au cours d'un essai préliminaire, nous avons mélangé 5 cm^3 de sérum de cheval et 2,5 cm^3 de solution de chromogène à 1 p. 1.000 nous avons ajouté ensuite 7,5 cm^3 d'une solution d'acide trichloracétique à 5 p. 100. Le mélange est alors filtré et un dosage de leucocyanidol est effectué sur le filtrat : 2,4 cm^3 de ce filtrat contiennent 18,1 γ de chromogène, alors que normalement ils devraient en contenir 398,4 γ. Ce résultat ne peut avoir de valeur que si des témoins sont effectués, car l'acide trichloracétique n'est pas sans avoir une action propre sur le leucocyanidol. A cet effet, nous avons réalisé une expérience identique en remplaçant le sérum, dans un premier essai témoin, par de l'eau physiologique et, dans un second essai témoin, par de l'eau distillée. Les 2,4 cm^3 de filtrat prélevés contenaient, dans le premiers cas, 60,6 γ, dans le second cas, 60,3 γ de chromogène.

Les protéines sériques fixent donc le chromogène leucoanthocyanique.

Dans une nouvelle expérience, nous avons cherché à savoir quelle est la fraction protéidique la plus active dans ce pouvoir fixateur. Pour cela, nous avons préparé des solutions d'albumines et de globulines sériques selon la technique classique d'Hofmeister (sulfate d'ammonium) ; nous avons dosé les protéines dans chaque solution et nous

les avons amenées au même titre (24 mg de protéines par cm³). Chacune des solutions a été soumise ensuite au même traitement.

5 cm³ de solution sont additionnés de 2,5 cm³ de solution de leucocyanidol (à 2,5 mg par cm³). Le mélange est additionné de 7,5 cm³ d'une solution d'acide trichloracétique à 5 p. 100. Après centrifugation, le liquide surnageant est recueilli et analysé :

2,4 cm³ de ce liquide contiennent 0,115 mg de chromogène dans le cas des albumines et 0,055 mg dans le cas des globulines, ce qui correspond pour la totalité du filtrat à 0,705 mg pour les albumines et 0,345 mg pour les globulines.

On peut donc conclure qu'il s'est fixé sur les albumines 5,54 mg et sur les globulines 5,90 mg de chromogène.

Le chromogène leuco-anthocyanique se fixe donc sur les albumines et sur les globulines, mais davantage cependant sur cette seconde fraction.

Désirant parfaire ce premier résultat, nous avons réalisé une étude consistant à soumettre à l'électrophorèse du sérum traité par le leucocyanidol et à rechercher sur le diagramme la fraction contenant ce pigment.

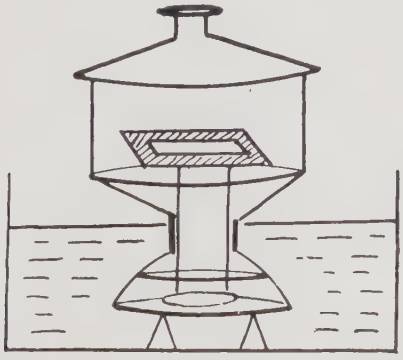


Fig. 6.

Pour cela, nous avons dû mettre au point une technique permettant de révéler le pigment. Après un certain nombre d'essais que nous ne rapporterons pas ici, nous avons adopté la technique suivante ; une lame de plexiglass ou

encore un fragment de film comporte un trou rectangulaire dont les dimensions correspondent au diagramme électrophorétique; le papier est donc fixé sur la lame à l'aide de colle. L'ensemble monté sur un support (fig. 6) est alors placé dans un récipient et soumis aux vapeurs d'alcool chlorhydrique. Le récipient contient à la partie inférieure un mélange d'acide chlorhydrique pur (une partie) d'alcool à 95° (une partie) et d'eau (deux parties). Le récipient est placé dans l'eau bouillante.

Dans ces conditions, le pigment se transforme en cyanidol et se colore en rouge. Il faut prendre de nombreuses précautions, car la bande de papier ainsi traitée se détruit au moindre contact. Un diagramme témoin sur lequel les protéines ont été révélées permet de savoir quelle est la fraction protéique ayant supporté les pigments.

L'expérience montre que le leucocyanidol se fixe sur les albumines et surtout sur les α_2 et β-globulines. Signalons que le leucocyanidol seul migre à l'électrophorèse, mais pas aussi loin qu'en présence de protéines.

Ce résultat confime notre étude précédente.

Conclusions du chapitre IV

Lorsque le leucocyanidol se trouve en présence de sérum sanguin, il se fixe sur les protéines, très peu sur les albumines, surtout sur α_2 et β-globulines.

CHAPITRE V

ÉTUDE DU POUVOIR INHIBITEUR EXERCÉ PAR LE CHROMOGÈNE LEUCO-ANTHOCYANIQUE VIS-A-VIS DE L'HYALURONIDASE

Cette étude nous a été suggérée par les recherches de Pautrizel, Mme Pautrizel-Bézian et Tayeau [64] concernant le pouvoir anti-anaphylactique du chromogène auquel nous avons fait précédemment allusion.

Il est utile, pour l'exposé qui va suivre, de rappeler les travaux de ces auteurs et quelques éléments bibliographiques sur la question.

Plusieurs auteurs avaient déjà cherché à mettre en évidence un effet anti-anaphylactique chez certaines substances vitaminiques P. La plupart avaient été amenés à conclure que celles-ci ne présentaient aucune action anti-anaphylactique (Roth et Sheppart [71]), Levitan [45], Arnoja et collaborateurs [4], Rosa et Gengiotti [70], Arbesman et collaborateurs [1], etc.).

Ces résultats ne sont pas exempts de critiques, car le choc anaphylactique *in vivo* utilisé dans les expériences constitue un phénomène beaucoup trop brutal; le choc anaphylactique *in vitro* (phénomène de Schulze-Dale) convient beaucoup mieux. C'est cette technique qu'ont utilisée Pautrizel, Mme Pautrizel-Bézian et Tayeau, qui ont

démontré d'une manière indiscutable que le chromogène leuco-anthocyanique exerce une action anti-anaphylactique.

Comment peut-on expliquer cette action ?

Deux conceptions se sont affrontées sur ce point :

1° Lecoq, Chauchard et Mme Mazoué [44] estiment que le chromogène intervient comme anti-histaminique. On sait en effet que la rencontre antigène-anticorps provoque la libération d'histamine responsable de la contraction dans le phénomène Schulze-Dale.

2° Tayeau et collaborateurs (voir 64) estiment cette conception inexacte, car le chromogène leuco-anthocyanique se montre absolument sans effet sur le choc histaminique *in vitro*. Pour Tayeau et Pautrizel, le leucocyanidol provoque simplement une modification des récepteurs tissulaires. Quelle peut donc être cette modification qui ralentit la rencontre antigène-anticorps ?

On sait que la substance fondamentale tissulaire est constituée en grande partie par de l'acide hyaluronique. Au cours de circonstances variées, l'acide hyaluronique se « fluidifie » sous l'influence d'un enzyme : l'*hyaluronidase;* ce dernier constitue donc un facteur de diffusion et peut éventuellement favoriser le contact antigène-anticorps. Toute substance inhibitrice de l'hyaluronidase est donc capable de ralentir la rencontre antigène-anticorps et de manifester en conséquence des propriétés anti-anaphylactiques. Nous nous sommes demandée alors si le pouvoir anti-anaphylactique du chromogène ne relevait pas de ce mécanisme, et nous avons cherché à le savoir.

Mesure de l'activité d'une préparation d'hyaluronidase

La technique la plus couramment utilisée est celle de Seastone [77]. Le principe consiste à mélanger dans des conditions bien déterminées et à *p*H 4,2 de l'acide hyaluronique, du sérum sanguin (de cheval) et de l'hyaluronidase. Dans ces conditions, les protéines sériques forment avec

l'acide hyaluronique un trouble intense; mais, au fur et à mesure que l'hyaluronidase décompose l'acide hyaluronique, ce trouble diminue et le liquide finit par être complètement limpide.

La technique consiste à mesurer avec un photomètre la diminution de ce trouble. Il existe des tables indiquant pour un trouble donné la viscosité correspondante.

Cette technique n'est pas exempte de critiques; comme le fait justement remarquer Valette [105], il existe parmi les protéines du sérum les fractions II et III de Cohn, qui constituent des inhibiteurs de l'hyaluronidase (anti-invasine de Haas). Malgré cela, la technique reste sans aucun doute la plus utilisée.

Nous avons donc cherché à la mettre en œuvre afin de voir si, en présence de leucocyanidol, la vitesse de disparition du trouble se trouvait freinée.

Nous avons dû renoncer tout de suite à utiliser cette technique, car le chromogène leuco-anthocyanique mélangé au sérum, sans acide hyaluronique, amène la formation d'un trouble sur lequel nous reviendrons plus loin.

Technique. — Nous avons donc eu recours à la vieille méthode classique consistant à faire des mesures de viscosité. Celles-ci doivent être faites dans des conditions absolument rigoureuses; il convient d'ailleurs d'opérer dans un thermostat.

Nous avons mis en œuvre le viscosimètre d'Ostwald; nous avons préparé l'acide hyaluronique à partir de cordons ombilicaux, selon la technique décrite par Darfman et Ott [22]. Nous avons utilisé l'hyaluronidase Grémy.

Mode opératoire. — Voici les diverses mesures que nous avons effectuées (à 37°).

1° Etalonnage du viscosimètre avec de l'eau : 84 secondes.

2° Mesure de la viscosité de l'acide hyaluronique (solution à 10 mg par cm^3 à laquelle on ajoute le 1/5e de son volume du tampon de Mc Hivain [*p*H 7]).

Première mesure : 270 secondes;

Deuxième mesure : 266 secondes;

Moyenne : 268 secondes.

3° Mesure de la viscosité de la solution d'hyaluronidase. On mélange 250 unités V. R. U. d'hyaluronidase (*), 40 cm³ d'eau distillée et 10 cm³ de tampon de Mc Hivain.

Première mesure : 84 secondes;

Deuxième mesure : 82 secondes;

Troisième mesure : 82 secondes.

4° Action de l'enzyme sur l'acide hyaluronique. On effectue le mélange suivant :

9 cm³ de la solution d'acide hyaluronique;

1,5 cm³ de la solution d'hyaluronidase;

1,5 cm³ d'eau.

Mesure immédiate : 219 secondes;

Après 45 minutes : 184 secondes.

5° Etude de l'action exercée par le leucocyanidol; on met en œuvre trois solutions :

a) A 0,5 mg par cm³;

b) A 0,1 mg par cm³;

c) A 0,01 mg par cm³.

Pour les mesures, on effectue les mélanges suivants :

1,5 cm³ de la solution d'hyaluronidase;

1,8 cm³ de la solution de leucocyanidol;

Puis après un contact de cinq minutes, on ajoute 9 cm³ de la solution d'acide hyaluronique. Finalement, les concentrations en leucocyanidol des trois milieux sont les suivantes :

a) 6,2 p. 100.000;

b) 1,2 p. 100.000;

c) 0,12 p. 100.000.

Voici nos résultats :

Premier mélange : 212 secondes;

Après 45 minutes : 198 secondes;

(*) Unité : quantité d'enzyme nécessaire pour abaisser de moitié la viscosité initiale en trente minutes.

Deuxième mélange : 210 secondes;
Après 45 minutes : 192 secondes;
Troisième mélange : 211 secondes;
Après 45 minutes : 183 secondes.

Interprétation des résultats. — Si l'on détermine la viscosité des différentes solutions par rapport à celle de l'eau prise comme unité, voici les chiffres trouvés :

Solution d'acide hyaluronique (à 0,83 mg par cm^3) : 3,19;
Solution d'hyaluronidase : 1,02 (donc négligeable) ;
Mélange acide hyaluronique - hyaluronidase :
Immédiatement : 2,60;
Après 45 minutes : 2,19.

La diminution observée est donc de 15,7 p. 100. La diminution réelle est certainement plus élevée, car au cours de la première mesure, l'hyaluronidase a déjà agi. Les différentes expériences étant effectuées exactement de la même façon, cette remarque ne présente qu'une importance relative.

Mélanges avec le chromogène :

a) Concentration : 0,12 p. 100.000.
Mesure immédiate : 2,51;
Après 45 minutes : 2,17;
Diminution de : *13,5 p. 100.*

b) Concentration : 1,2 p. 100.000.
Mesure immédiate : 2,50;
Après 45 minutes : 2,28;
Diminution : 8,8 p. 100.

c) Concentration : 6,2 p. 100.000.
Mesure immédiate : 2,52;
Après 45 minutes : 2,35;
Diminution : 6,7 p. 100.

En résumé, voici les résultats obtenus :

Diminution de la viscosité :

1° En l'absence de chromogène (témoin)... 15,7 p. 100,

2° En présence de chromogène :

a) 0,12 p. 100.000 ..... 13,5 p. 100
b) 1,2 p. 100.000 ..... 8,8 p. 100
c) 6,2 p. 100.000 ..... 6,7 p. 100.

Il apparaît donc nettement que le chromogène leucoanthocyanique de l'arachide exerce un effet inhibiteur vis-à-vis de l'hyaluronidase. Cet effet nous permet d'expliquer les propriétés anti-anaphylactiques auxquelles nous avons fait allusion au début de ce chapitre.

Alors que nos travaux étaient en cours de réalisation paraissait en Amérique un travail de Beiler et Martin [7] concernant les propriétés antihyaluronidasiques de certaines vitamines P. Ces auteurs ont mis en œuvre la technique de Seastone [77], les vitamines P utilisées ne précipitant pas avec les protéines sériques. Ils concluent que, parmi les substances étudiées (rutoside, esculétol, esculoside, hespéridoside, chalcone correspondante, 4-méthylesculoside), seul le rutoside présente une action antihyaluronidasique et encore à la concentration de 1 p. 1.000. Cette concentration est très notablement plus élevée que celles mises en œuvre dans notre étude.

Plus tard (*), Rodney et collaborateurs [69] réalisaient une très importante étude sur le même sujet; ils mettaient en œuvre trente dérivés flavoniques et concluaient de leur étude que, pour posséder un effet antagoniste vis-à-vis de l'hyaluronidase, des OH libres en 3' et 4' s'avéraient nécessaires; la méthylation de l'OH en 3' réduit nettement l'activité.

Ces différentes recherches avaient été suggérées par une idée différente de celle nous ayant amenée à étudier l'action du leucocyanidol de l'arachide sur l'hyaluronidase. Les auteurs précités avaient voulu étudier le mécanisme de l'effet exercé par l'hyaluronidase sur la perméabilité capil-

(*) Signalons encore à ce sujet le travail de Clark et Geissman [17].

laire (Cella et Means [15], Bunting et Wislocki [14], Duran-Reynals [24], Chambers et Zweifach [16]).

Il est intéressant de constater que deux études différentes ont conduit à un même résultat.

Conclusions du chapitre V

Nous avons démontré, dans ce chapitre, que le chromogène leuco-anthocyanique de l'arachide exerce un net effet inhibiteur vis-à-vis de l'hyaluronidase.

CHAPITRE VI

ÉTUDE DU POUVOIR INHIBITEUR EXERCÉ PAR LE CHROMOGÈNE LEUCO-ANTHOCYANIQUE VIS-A-VIS DE L'ESTÉRIFICATION DU CHOLESTÉROL SÉRIQUE

Le métabolisme des lipides présente encore un certain nombre de points vulnérables, malgré les prodigieuses recherches dont il a fait l'objet. Parmi ces points vulnérables reste le problème du transport des acides gras. Il semble, néanmoins, que l'estérification du cholestérol sanguin en constitue un stade essentiel.

Par des expériences *in vitro,* il est possible de mettre en évidence le pouvoir que possède le sérum d'estérifier son cholestérol.

Sperry [80] a montré, en effet, que si l'on place du sérum à l'étuve à 37° et pendant soixante-douze heures, le cholestérol estérifié augmente aux dépens du cholestérol libre. Le phénomène ne se produisant pas lorsque le sérum a été préalablement chauffé à 56° pendant une heure, Sperry conclut que cette estérification est due à un enzyme, la *cholestérolestérase* sérique.

Par la suite, M^lle^ Le Breton et Pantaléon [36] ont prouvé que les acides gras nécessaires à l'estérification du

cholestérol provenaient de l'hydrolyse des lécithines, sous l'influence d'une lécithase B; il existe, en effet, un parallélisme étroit entre l'estérification du cholestérol et l'hydrolyse des lécithines [37].

Signalons qu'un certain nombre de substançes inhibent la réaction (sels biliaires [81], saponosides [101], monobromacétate de sodium, phloridzoside [36], etc.).

Pour des raisons exposées par ailleurs (voir 101, 90), Swell et Treadwell [84] n'admettent pas l'existence de la cholestérolestérase sérique chez la plupart des animaux (sauf le Chien); pour ces auteurs, l'estérification du cholestérol constitue un phénomène physico-chimique étroitement lié à l'état de dispersion du cholestérol au sein des associations lipido-protéidiques. Au cours de toutes récentes recherches, mettant en œuvre l'électrophorèse, Tayeau et Nivet [100] sont effectivement parvenus à montrer que toutes les substances qui perturbent les associations lipido-protéidiques constituent des inhibiteurs de l'estérification du cholestérol.

Or, nous avons montré (voir p. 58) que le chromogène leuco-anthocyanique de l'arachide perturbe les associations lipido-protéidiques. Allait-il, lui aussi, inhiber l'estérification du cholestérol ? C'est ce que nous avons cherché à savoir.

Nous avons effectué un certain nombre d'expériences qui, toutes, ont donné le même résultat; nous ne rapporterons ici que l'une d'entre elles.

On prépare quatre échantillons de 5 cm^3 de sérum de cheval fraîchement recueilli; à deux d'entre eux (série M, tubes C et D), on ajoute 0,6 cm^3 d'une solution de chromogène leuco-anthocyanique à 3 p. 1.000; le sérum contient donc 0,32 mg de chromogène par centimètre cube; aux deux autres (série témoin, tubes A et B), on ajoute 0,6 cm^3 d'eau physiologique. Les deux échantillons A et C sont placés à la glacière; les deux autres à l'étuve à 37° pendant soixante-douze heures. Après ce laps de temps, chaque

échantillon fait l'objet d'un dosage de protéines, de lipides, de cholestérol total (*) et de chosletérol libre (**).

Voici nos résultats (tableau III) :

TABLEAU III

		Sérums restés a la glacière	Sérums placés a l'étuve a 37°
Témoin	Protéines	0,363 g	0,361 g
	Lipides	11,7 mg	12,2 mg
	Cholestérol total	440 γ	445 γ
	Cholestérol libre	28 γ	11 γ
En présence de chromogène.	Protéines	0,371 g	0,397 g
	Lipides	14,8 mg	14,7 mg
	Cholestérol total	455 γ	440 γ
	Cholestérol libre	32 γ	26 γ

Ces résultats montrent que, dans le témoin, 57 p. 100 du cholestérol libre a été estérifié, tandis qu'en présence de chromogène 17 p. 100 seulement du cholestérol ont subi l'estérification.

Cette observation est sans doute en rapport avec une toute récente publication de Di Maggio [23] : cet auteur a montré que les vitamines P provoquent *in vivo* des modifications de la lipémie et des changements dans le diagramme électrophorétique.

Conclusions du chapitre VI

Par son pouvoir de modifier l'état de dispersion du cholestérol du sérum sanguin, le chromogène leuco-antocyanique de l'arachide constitue un inhibiteur de l'estérification du cholestérol sérique.

(*) Le cholestérol total est dosé sur l'extrait lipidique par la technique colorimétrique.

(**) Le cholestérol libre est dosé par la méthode de Windaus-Caminade.

CHAPITRE VII

ACTION INHIBITRICE DE LA VITAMINE P SUR LES IONS CUIVRE

I. — Détermination de la concentration des ions Cu^{++} la plus favorable a l'oxydation de la vitamine C

Technique. — La verrerie utilisée dans cette expérience, après avoir subi les lavages de rigueur, est rincée à l'eau bidistillée (exempte de cuivre) et séchée à l'abri de toute souillure.

On introduit dans quatre fioles de Fourneau 2 mg d'acide ascorbique. Dans les fioles n°s 2, 3, 4, on ajoute respectivement 10 cm^3 des solutions titrées :

10^{-5}M - 10^{-6}M - 10^{-7}M concentration en Cu^{++}.

La fiole n° 1 reçoit 10 cm^3 d'eau bidistillée et sert de témoin.

Le bain-marie à 40° C. étant équilibré, on y introduit simultanément les fioles. On prélève alors 2 cm^3 de la solution et, dans chaque fiole, on détermine, aussitôt après le mélange et après trente minutes de séjour au bain-marie, la quantité d'acide ascorbique oxydé, par titrage au dichlorophénol-indophénol.

C'est le tube n° 2 correspondant à 10^{-5} M Cu^{++} qui donne le résultat le plus facile à lire (oxydation de 70 p. 100).

II. — Étude de l'oxydation de l'acide ascorbique par les ions Cu^{++} en présence du chromogène et des autres vitamines P.

Le cuivre est d'abord mis en contact pendant dix minutes avec les vitamines : chromogène, rutoside, esculoside.

Technique. — Chaque flacon renfermant 2 mg de chacune des vitamines et 10 cm^3 de la solution 10^{-5} M Cu^{++}, on laisse en contact dix minutes au bain-marie à 40° C. et on ajoute 10 cm^3 de solution renfermant 2 mg d'acide ascorbique. Un témoin est préparé sans vitamine. On note au t_0, au t_1 (dix minutes après), au t_2 (trente minutes après) les quantités de vitamine C oxydées dans les diverses fioles.

Modalités pratiques de dosage. — La solution de dichlorophénol-indophénol étant introduite dans la burette de Mohr, on prélève dans un erlenmeyer 2 cm^3 de la solution d'un ballon auxquels on ajoute 5 cm^3 de SO_4H_2 N/10. On laisse tomber goutte à goutte la solution de dichloro-phénol-indophénol jusqu'à coloration rose persistante quinze secondes.

Remarques. — On utilise une solution de rutoside préparée à chaud, sa dissolution à froid étant pratiquement nulle. Lors des mesures photométriques, il n'apparaît aucun trouble gênant les opérations.

Comme dans l'essai précédent, il est de nécessité absolue de n'utiliser que de la verrerie rincée à l'eau bidistillée et de n'utiliser que cette eau au cours de l'expérience.

Conclusions du chapitre VII

Le chromogène protège la vitamine C de l'oxydation alors que les autres facteurs vitaminiques P n'inhibent que

très peu cette oxydation (rutoside) ou encore la favorisent (esculoside).

Le chromogène capterait peut-être les ions Cu^{++}, empêchant ainsi l'oxydation de la vitamine C. Il apparaîtrait donc, à la suite de ces travaux, un nouvel usage du leucocyanidol en thérapeutique.

CHAPITRE VIII

ACTION DU LEUCOCYANIDOL SUR L'ACIDE ASCORBIQUE OXYDASE

L'inhibition par le chromogène de l'activité oxydante des ions Cu^{++} sur l'acide ascorbique étant démontrée, il est intéressant de voir comment il agit sur les enzymes dits cupriques.

I. — Préparation de l'acide ascorbique oxydase

Plusieurs auteurs déjà avaient isolé cet enzyme soit du *Cucurbita maxima* (Tauber, Kleiner et Mishkind), soit du Hubbard squash, soit du chou pomme.

Les essais que nous avons faits ont été réalisés avec l'enzyme extrait du *Cucurbita maxima,* dit potiron.

1 kg de péricarpe mûr est pulpé et agité pendant cinq minutes avec 3 litres d'alcool à 30° C. On centrifuge, on filtre et on ajoute un volume égal d'acétone. Un précipité jaune apparaît en surface, que l'on prélève avec un agitateur, et qui est introduit dans un erlenmeyer. On le lave à l'acétone qui s'empare du pigment jaune.

La masse spongieuse et blanchâtre est dissoute dans 400 cm^3 d'eau bidistillée et précipitée à nouveau par un égal volume d'acétone. On renouvelle cette opération et on dessèche le précipité dans le vide sulfurique.

Remarques. — Opérer très rapidement, en présence d'acétone qui inhibe l'enzyme.

L'enzyme sec se dissout dans l'eau en une ou deux heures, et la solution se conserve bien à la glacière.

Son milieu optimum d'activité est une solution d'acétate de *p*H 5,6. Il est inactif au-dessous de *p*H 4 et au-dessus de *p*H 7.

II. Définition de l'activité enzymatique

Masquelier, dans son article : « Action comparée de divers facteurs vitaminiques P sur l'acide ascorbique oxydase », définit l'*unité* de l'activité enzymatique de la façon suivante [52] :

1 cm³ de la solution capable d'oxyder en trente minutes, à 37° C., 95 p. 100 d'une solution de 2 mg d'acide ascorbique dans 10 cm³ de tampon à *p*H 6,0.

En collaboration avec lui, nous avons effectué le titrage d'enzyme de la façon suivante :

Dans quatre fioles de Fourneau, on introduit 1 cm³ de la solution d'enzyme à essayer et de ses dilutions dans l'eau bidistillée, puis 10 cm³ d'une solution tampon *p*H 6,0 renfermant 2 mg d'acide ascorbique. Une cinquième fiole servant de témoin renferme 1 cm³ d'eau bidistillée au lieu d'enzyme. On pratique aussitôt après le dosage de la vitamine C et on porte les fioles au bain-marie à 37° C. pendant trente minutes, après quoi on ajoute 2 cm³ d'acide sulfurique N/10 dans chaque récipient et on fait un nouveau dosage de la vitamine C. On ajuste la solution pour qu'elle réponde à la définition de l'unité.

III. Action du leucocyanidol sur l'acide ascorbique en présence d'enzyme

Après plusieurs essais tendant à montrer :

1° Que le mélange enzyme + leucocyanidol ne gêne en rien les mesures photométriques;

2° Que le bisulfite des solutions de chromogène n'agit pas sur le pouvoir enzymatique et n'inhibe pas l'oxydation;

On met en contact le chromogène à dose croissante et l'enzyme pendant dix minutes. On ajoute dans chaque flacon 10 cm³ de solution de vitamine C dans le tampon phosphaté *p*H 6,0. Au t_0 et au t_1 (trente minutes au bain-marie à 37° C.), on détermine la quantité de vitamine C oxydée. Celle-ci correspond environ au tiers de la quantité mise en jeu.

Des essais comparatifs réalisés avec le rutoside et l'esculoside montrent là encore l'avantage que présente sur ces vitamines le leucocyanidol, les premières étant inactives, et lui inhibiteur de l'oxydation.

CHAPITRE IX

ACTION DU LEUCOCYANIDOL SUR LA TYROSINASE EN ACTION SUR L'ADRÉNALINE

I. — Extraction de l'enzyme

Râper finement des pommes de terre épluchées avec le tiers de leur poids d'eau. Le filtrat conservé à 10° C. reste actif pendant soixante-douze secondes.

Remarque importante. — Cette solution d'enzyme noircit rapidement, il faut donc l'utiliser très vite sous peine de voir les mesures photométriques erronées.

II. — Essais préliminaires

On prend six tubes. Dans le n° 5, on introduit 5 cm³ de solution saturée de tyrosine et, dans le sixième, de l'eau bidistillée; puis, dans tous, des quantités croissantes de tyrosinase et 1 cm³ de tampon à *p*H 7,1. Les tubes sont placés l'un après l'autre et dans l'ordre dans un bain-marie à 40° C. Au bout de trente minutes apparaît une coloration beige rosée pour les concentrations les plus fortes en tyrosinase.

Dans un autre essai, on remplace la solution saturée de tyrosine par une solution bisulfitée d'adrénaline à 1 p. 1.000. En opérant de la même manière que précédemment et en

comparant avec des témoins, on remarque qu'après trois heures de contact au bain-marie à 40° C., il se produit une coloration beige rosée dans tous les tubes, mais nettement plus importante dans le tube qui renferme à la fois l'adrénaline et la tyrosine.

Enfin, dans une troisième expérience, après un contact de dix minutes entre le leucocyanidol et la tyrosinase, on ajoute la solution bisulfitée d'adrénaline. Les tubes sont placés dans les mêmes conditions que précédemment et, au bout du même temps, on remarque une inhibition totale, sauf dans le témoin sans chromogène.

Remarques. — Ces résultats furent obtenus à l'aide de solutions bisulfitées d'adrénaline et de leucocyanidol. Une expérience rapide, faite avec une solution bisulfitée de même titre que celle de la vitamine P, a montré que le bisulfite était lui-même inhibiteur de l'oxydation, à moins qu'il ne décolore tout simplement le milieu, ce qui pour l'œil revient au même.

III. — Action du chromogène pur non bisulfité sur la tyrosinase

On introduit dans quatre tubes 5 cm^3 de solution saturée de tyrosine, 1 cm^3 de solution de *p*H 7,1 et une quantité croissante de solution de chromogène non bisulfité. On laisse dix minutes en contact et on ajoute dans tous les tubes XX gouttes de tyrosinase. Un témoin est préparé sans leucocyanidol.

Après soixante minutes de contact au bain-marie, il n'apparaît aucune coloration, sauf dans le témoin.

Après cent minutes de contact dans les mêmes conditions, il apparaît une coloration beige qui s'égalise dans tous les tubes, sauf dans le témoin qui est noir.

IV. — Action du chromogène pur sur la tyrosinase en présence d'adrénaline

La solution de chromogène utilisée est récemment préparée dans l'eau bidistillée. Le mode opératoire est le même. La vitamine P est mise en contact durant dix minutes avec l'enzyme.

Au bout de plusieurs heures, les colorations s'égalisent dans tous les tubes, mais la réaction est plus lente que dans les autres essais.

V. — Action respective des trois vitamines P sur l'oxydation de l'adrénaline par la tyrosinase

Cette expérience se réalise à température ambiante. La solution de rutine étant colorée en jaune, il y a lieu d'en tenir compte pour les mesures photométriques.

Le tube renfermant le chromogène accuse toujours un retard de coloration par rapport à la concentration. Ce retard est encore plus net lors de l'action de ce corps sur la tyrosine pure.

Conclusions du chapitre IX

Alors que la rutine et l'esculoside se montrent inopérants sur l'oxydation enzymatique de l'adrénaline, le leucocyanidol la retarde considérablement sans l'inhiber, comme on aurait pu le croire, en n'utilisant que des solutions bisulfitées.

CHAPITRE X

ACTION DU LEUCOCYANIDOL SUR LE SÉRUM SANGUIN

Au cours de notre étude sur les propriétés « antihyaluronidase » du leucocyanidol, nous avons signalé que ce chromogène amenait la formation d'un précipité lorsqu'on le mettait en présence de sérum sanguin.

Nous avons cherché à préciser ce phénomène et nous l'avons étudié en détail.

Dans un essai préliminaire, nous avons dissous du chromogène leuco-anthocyanique dans du sérum de cheval (concentration : 4 p. 1.000) ; nous avons recueilli le précipité et nous l'avons analysé. Nous avons constaté qu'il contenait la totalité des substances lipidiques du sérum et des traces seulement de protéines.

Dans un autre essai, nous avons cherché à préciser ce premier résultat et nous avons étudié l'influence jouée par la concentration en chromogène sur la composition du précipité.

Pour cela, nous avons réalisé les mélanges indiqués dans le tableau IV.

Les échantillons sont soumis à la centrifugation et le précipité recueilli est analysé : nos résultats sont réunis dans le tableau V (correspondant à 100 cm^3 de sérum traité) :

TABLEAU IV

Nos	Sérum	Solution de leucocyanidol à 33 p. 1.000	Poids correspondant de leucocyanidol (en mg)	Eau physiologique
1	20	0	0	1,80
2	20	0,15	5	1,65
3	20	0,30	10	1,50
4	20	0,60	20	1,20
5	20	0,90	30	0,90
6	20	1,20	40	0,60
7	20	1,50	50	0,30
8	20	1,80	60	0

TABLEAU V

Nos	Leucocyanidol (en mg)	Protéines (en mg)	Lipides (en mg)	Cholestérol (en mg)	Phosphore (en mg)
1	0	0	0	0	0
2	25	0,01	0	0,0006	0
3	50	0,17	0,066	0,009	0
4	100	0,18	0,070	0,012	0,80
5	150	0,30	0,100	0,019	0,92
6	200	0,70	0,206	0,050	1,95
7	250	1,09	0,226	0,067	2,28
8	300	1,60	0,276	0,094	2,38

Ces résultats montrent qu'à la concentration de 3 p. 1.000, le leucocyanidol précipite la totalité des lipides contenus dans le sérum; l'analyse des eaux-mères prouve effective-

ment qu'à cette concentration, tous les lipides ont été précipités.

Si l'on étudie l'influence exercée par le *p*H sur le milieu, on s'aperçoit qu'en milieu alcalin le chromogène précipite de moins en moins de lipides.

Ces divers résultats sont à rapprocher des recherches effectuées par Polonovski et Machebœuf [65] ; ces auteurs ont, en effet, montré que certains savons cationiques, le zéphirol en particulier, possèdent la propriété de précipiter les lipides du sérum sanguin en entraînant seulement une faible quantité de protéines. Cependant, deux points particuliers diffèrent entre les expériences des auteurs précités et les nôtres :

1° La précipitation des lipides est plus abondante en milieu alcalin qu'en milieu neutre; avec le leucocyanidol, nous observons l'inverse. Ceci n'est pas étonnant, car le zéphyrol est cationique, tandis que le leucocyanidol peut être considéré par ses fonctions phénol comme anionique.

2° L'éther, en présence de zéphyrol, permet d'extraire jusqu'à 70 p. 100 des lipides sériques; en présence de chromogène leuco-anthocyanique, il n'en extrait que très peu.

Voici d'ailleurs les résultats d'une de nos expériences, dans laquelle nous avons analysé les lipides et le cholestérol extraits par l'éther de 100 cm³ de sérum de Cheval en présence de quantités variables de chromogène (tableau VI).

Ces résultats mettent en évidence le fait qu'il existe une concentration optimum en chromogène pour laquelle l'extraction des lipides est maximum. Il convient cependant de noter que la quantité maximum de lipides extraits est minime, puisqu'elle ne représente que 5 p. 1.000 environ de la totalité. Nous sommes loin des chiffres obtenus avec le zéphyrol !

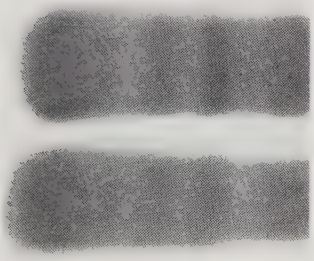
Afin d'apporter quelques compléments d'information à ces données, nous avons soumis parallèlement à l'électrophorèse sur papier (appareil de Machebœuf et Rebey-

TABLEAU VI

Leucocyanidol (en mg)	Lipides (en mg)	Cholestérol (en mg)
0	11,0	0,8
25	15,5	5,0
50	11,5	3,5
100	5,0	1,1
150	6,0	1,3
200	1,5	0,75

rotte) du sérum de cheval et le même sérum traité par le leucocyanidol (protéinogramme et lipidogramme).

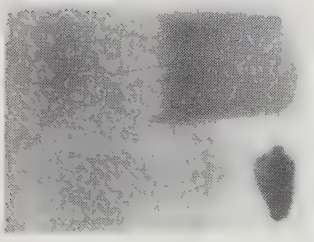
L'expérience montre que le protéinogramme ne subit pas de modifications qualitatives appréciables, tandis que le lipidogramme révèle que les lipides ont été « détachés », ceux-ci restent en effet sur le front de départ (fig. 7).



Protéinogramme

Sérum d'homme (témoin).

Sérum d'homme + leucocyanidol.



Lipidogramme

Sérum d'homme (témoin).

Sérum d'homme + leucocyanidol.

Quelles sont les conclusions qui ressortent de ces divers résultats ?

Pour répondre à cette question, il est indispensable d'avoir présente à l'esprit la structure des associations lipidoprotéidiques du sérum sanguin. Nous ne pouvons pas traiter ici cette longue et délicate question. Nous renvoyons le lecteur à une toute récente revue de Tayeau [90]. Nous résumerons simplement nos connaissances sur ce point.

Les molécules protéidiques se trouvent unies aux phospholipides par des liaisons ioniques (union entre un groupe positif de la protéine, amine probablement, et un groupe négatif de phospholipides, acide phosphorique très certainement) ; ce sont alors sur les molécules de phospholipides que se trouvent fixées les autres substances lipidiques, dont le cholestérol, cette dernière fixation s'effectuant par des forces de van der Waals. Les phospholipides formeraient donc le trait d'union entre les protéines et les diverses substances lipidiques (voir 90). L'action du leucocyanidol peut s'expliquer de deux façons :

1° On peut admettre que le leucocyanidol « coupe » la molécule de protéine tout près de l'endroit où s'effectue la liaison avec les lipides, ce qui expliquerait que le précipité lipidique entraîne avec lui quelques substances protidiques, celles qui assurent la fixation avec la copule lipidique. Tayeau, Nivet, Mlles Faure et Dumas ont cru que l'analyse de cette fraction protidique pourrait renseigner sur la nature des amino-acides participant à la liaison avec les lipides; l'étude chromatographique réalisée sur ce sujet par les auteurs précités a montré qu'il n'en était rien; les amino-acides trouvés sont absolument les mêmes que ceux entrant dans la constitution des protéines sériques totales.

2° On peut encore admettre que la fraction protéidique qui assure la liaison avec les lipides est quantitativement minime par rapport aux protéines totales et que cette fraction est entraînée avec les lipides sous l'influence du chromogène leuco-anthocyanique. C'est plutôt à cette seconde hypothèse que nous nous rangeons.

Applications

1° *Etude des vieux sérums.* — Au cours de recherches déjà anciennes, Tayeau [86, 102] a montré que le vieillissement des sérums était surtout caractérisé par une stabilité beaucoup plus grande des associations lipido-protéidiques. Il nous a donc paru intéressant de savoir si cette stabilité plus grande allait se réfléter sur nos expériences.

Nous avons donc réalisé deux essais parallèles, l'un sur un sérum de cheval frais, l'autre sur un sérum de cheval vieilli, conservé dix ans à + 4°.

Le tableau VII indique nos résultats, correspondant à 100 cm³ de sérum.

TABLEAU VII

Poids de leucocyanidol (en mg)	LIPIDES	
	Sérum frais	Sérum vieilli
80	0,08	0,05
160	0,09	0,06
280	0,13	0,07
400	0,44	0,09

Ces résultats montrent qu'avec un sérum vieilli, le chromogène ne permet pas la précipitation de la totalité des lipides. Cet essai confirme les travaux antérieurs sur la plus grande stabilité des associations lipido-protéidiques des sérums vieillis.

2° *Etude sur les immunsérums.* — On sait depuis longtemps (Hartley [27]) que la délipidation d'un immunsérum précipitant amène la disparition du pouvoir floculant. Les diverses études réalisées sur ce sujet par Tayeau,

Neuzil, Pautrizel et Marquevielle [98, 99, 91, 92, 47] ont conduit ce dernier auteur à admettre que la « délipidation » du sérum produit simplement un retard à la floculation; si, en effet, celle-ci ne se produit généralement plus après délipidation, c'est en raison de l'effet traumatisant dû aux techniques employées.

Le leucocyanidol permettant l'enlèvement des lipides d'un sérum, sans l'emploi de réactifs traumatisants comme l'alcool ou l'acétone, nous avons pensé l'utiliser pour étudier le rôle des lipides dans la réaction de précipitation spécifique.

Il importait avant toute étude de bien vérifier que les quelques protéines entraînées avec les lipides précipités n'étaient pas constituées par des anticorps. Nous avons pu constater qu'aucun anticorps ne se trouvait dans le précipité.

Nous avons donc réalisé diverses séries d'expériences avec des sérums antidiphtériques de cheval.

Voici les mélanges que nous avons effectués :

	I	II	III	IV
Sérum frais	3	3	3	3
Solution de leucocyanidol à 25 mg par cm³.	0,1	0,2	0,35	0,50
Eau physiologique	0,40	0,30	0,15	0

Le précipité formé est éliminé par centrifugation.

Voici les temps de floculation observés pour différentes concentrations relatives entre antigène et anticorps (tableau VIII).

L'expérience montre donc que la « délipidation » avec le leucocyanidol retarde nettement les temps de floculation, mais ne fait pas disparaître le phénomène. Ce résultat confirme les conclusions émises par Marquevielle [47].

TABLEAU VIII

Vol. de toxine diphtérique mise en œuvre (en cm³)....		1,3	1,4	1,5	1,6	1,7	1,8	1,9
Temps de floculation (minutes)	Témoin..	49	44	44	44	59	70	.....
	N° I.....	.....	56	56	52	56	64	85
	N° II....	.....	55	60	53	56	.....	82
	N° III...	.....	69	76	64	74	75	90
	N° IV...	.....	70	74	68	72	75	.....

Conclusions du chapitre X

Nous avons montré que le leucocyanidol de l'arachide permet la précipitation de la totalité des lipides du sérum sanguin. Ce résultat conduit à diverses conclusions théoriques sur la nature des associations lipido-protéidiques.

La nouvelle technique de « délipidation » ainsi décrite apporte des arguments à certaines hypothèses émises précédemment concernant les sérums vieillis et le phénomène de floculation spécifique.

CONCLUSIONS GÉNÉRALES

Nous rappelons tout d'abord les recherches de Tayeau et Masquelier sur les pigments du tégument de l'arachide, et nous portons particulièrement notre attention sur la structure chimique du chromogène leuco-anthocyanique.

Nous discutons ensuite quelques théories sur la biogenèse des dérivés flavoniques et nous échafaudons une hypothèse sur l'origine possible des pigments de l'arachide.

Nous décrivons, dans un troisième chapitre, les propriétés biologiques du leucocyanidol et nous insistons particulièrement sur son rôle dans le renforcement de la résistance vasculaire. Nous rappelons enfin les propriétés antivitaminiques P du tannoïde, isolé et étudié par Masquelier.

Après avoir ainsi rappelé les travaux antérieurs sur notre sujet de travail, nous abordons nos recherches expérimentales.

Dans un premier chapitre, nous réalisons une étude comparative concernant l'activité des principales substances vitaminiques P et nous montrons que le leucocyanidol de l'arachide constitue l'une des substances les plus actives.

Dans un second chapitre, nous donnons les caractéristiques spectrophotométriques du leucocyanidol et de son dérivé de déshydratation, le cyanidol.

Dans le troisième chapitre, nous montrons les difficultés que présente le dosage biologique des substances vitaminiques P, et nous proposons une technique nouvelle permettant le dosage photométrique du leucocyanidol. Cette

technique permet de doser des quantités de l'ordre de 50 γ par cm^3.

Nous abordons ensuite des recherches biologiques mettant en œuvre des techniques physico-chimiques et électrophorétiques. Nous montrons, dans le chapitre IV, que le leucocyanidol possède la propriété de se fixer sur les protéines sériques et particulièrement sur les globulines.

Dans le chapitre V, nous cherchons à expliquer les propriétés anti-anaphylactiques du leucocyanidol (Pautrizel et Tayeau), et nous y parvenons en montrant que cette substance agit comme antagoniste de l'hyaluronidase.

L'hyaluronidase n'est pas le seul enzyme auquel s'oppose le leucocyanidol, la cholestérolestérase du sérum sanguin se trouve également inhibée par ce pigment (chapitre VI).

Nous prouvons que le leucocyanidol manifeste une action inhibitrice non seulement vis-à-vis de l'oxydation de l'acide ascorbique par les ions cuivre (chapitre VII), mais encore vis-à-vis de l'acide ascorbique oxydase (chapitre VIII) et de la tyrosinase (chapitre IX).

Dans le dixième et dernier chapitre, nous mettons en évidence le fait que le leucocyanidol possède la curieuse propriété, à la concentration de 3 p. 1.000, de précipiter la totalité des lipides du sérum sanguin. Le précipité lipidique n'entraîne que de relativement faibles quantités de protéines. Ce résultat nous permet d'émettre des conclusions sur les associations lipido-protéidiques du sérum sanguin. Si l'expérience est pratiquée sur un immunsérum, la totalité des anticorps reste en solution. Nous proposons ainsi une nouvelle technique permettant la délipidation des immunsérums et ne mettant en œuvre aucun réactif traumatisant comme l'alcool ou l'acétone.

Enfin, grâce à cette technique, nous confirmons les recherches antérieures montrant l'accroissement de stabilité des associations lipidoprotéidiques dans les sérums vieillis.

BIBLIOGRAPHIE

1. Arbesman C. E., Neter E. & Becker C. F., *J. Allergy*, 1950, **21**, 25.
2. Armentano L. E. B., *Z. Ges. exp. Med.*, 1937, **102**, 219.
3. Armentano L. E. B., Bensath A., Beres T., Rusznyack S. & Szent-Györgyi A., *Deut. Med. Wochschr.*, 1936, **62**, 1325.
4. Arnoja E., Lorente L., Aguirre M. & Perianes J., *Rev. Clin. española*, 1949, **35**, 86.
5. Bacharach A. C., Coates M. E. & Middleton T. R., *Proc. Biochem. Soc. Chem. Ind.*, 1942, **61**, 96.
6. Bancroft W. D. & Rutzler J. E., *J. Am. Chem. Soc.*, 1938, **60**, 2738.
7. Beiler J. M. & Martin G. J., *J .biol. Chem.*, 1947, **171**, 507.
8. Bezssonoff N., *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1927, **9**, 568.
9. Birch A. J., Donovan F. W. & Moewus F., *Nature*, 1953, **172**, 902.
10. Blaschko H., *Biochem. J.*, 1944, **38**, 6.
11. Bougault J., Thèse Sc., Paris, 1902.
12. Boulanger P., *Exp. ann. Biochim. méd.*, 1944, **4**, 169.
13. Bourne G. H., *Nature*, 1943, **152**, 659.
14. Bunting H. & Wislocki G. B., *Am. J. Anat.*, 1947, **81**, 1.
15. Cella L. J. & Means J. A., *Marquette Med. Rev.*, 1948, **13**, 67.
16. Chambers R. & Zweifach B. W., *Physiol. Rev.*, 1947, **27**, 436.
17. Clark W. G. & Geissman T. A., *J. Pharm. exp. Therap.*, 1949, **95**, 363.
18. Clark W. G. & Mc Kay E. M., *J. Am. Med. Assoc.*, 1950, **143**, 1411.
19. Colloque international sur les hétérocycles oxygénés. Lyon, septembre 1955. Editions du C. N. R. S., sous presse.
20. Combes R., *C. R. Acad. Sc.*, 1913, **157**, 1002.
21. Dangoumeau A., Debruyne H. & Cluzan R., *Bull. Soc. Chim.*, 1951, 435-482.
22. Darfman A. & Ott M. L., *J. biol. Chem.*, 1948, **172**, 367.
23. Di Maggio G., III[e] Congrès internat. Biochimie, Bruxelles, 1955, p. 131.

24. Duran-Reynals F., *Yale J. Biol. Med.*, 1939, **11**, 601.
25. Frey-Wissling A. & Blank F., *Ber. schweiz. bot. ges.*, 1943, **53 A**, 550.
26. Géro E. & Galmiche P., *C. R. Soc. Biol.*, 1946, **140**, 846.
27. Hartley P., *Brit. J. exp. Pathol.*, 1925, **6**, 180.
28. Jensen H., Thèse Univ. (Pharm.), Bordeaux, 1952.
29. Karrer P., *Bull. Soc. Chim.*, 1928, 1401.
30. Kramar J. & Levine V. E., *J. Nutrition*, 1953, **50**, 149.
31. Kryz F., *Chem. Centr.*, 1922, **93**, 738.
32. Lavollay J., *C. R. Soc. Biol.*, 1943, **137**, 23.
33. Lavollay J., Congrès de la victoire de l'A. F. A. S., Paris, 1945.
34. Lavollay J. & Neumann J., *C. R. Acad. Sc.*, 1941, **212**, 251.
35. Lavollay J. & Neumann J., *Exp. ann. Biochim. méd.*, 1949, **10**, 59.
36. Le Breton E. & Pantaléon J., *Arch. Sc. physiol.*, 1947, **1**, 63.
37. Le Breton E. & Pantaléon J., *Exp. ann. Biochim. méd.*, 1947, **7**, 111.
38. Lebreton M., *J. Pharm. Chim.*, 1928, **14**, 377.
39. Lecoq R., *C. R. Acad. Sc.*, 1952, **235**, 585.
40. Lecoq R., Chauchard P. & Mazué H., *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1947, **29**, 717.
41. Lecoq R., Chauchard P. & Mazoué H., *C. R. Soc. Biol.*, 1949, **143**, 454.
42. Lecoq R., Chauchard P. & Mazoué H., *Thérapie*, 1949, **4**, 232.
43. Lecoq R., Chauchard P. & Mazoué H., *C. R. Soc. Biol.*, 1950, **144**, 27.
44. Lecoq R., Chauchard P. & Mazoué H., *Tunisie méd.*, 1951, **29**, 930.
45. Levitan B. A., *Rev. Can. Biol.*, 1949, **8**, 370.
46. Macheboeuf M. & Tayeau F., *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1942, **24**, 281.
47. Marquevielle J., Thèse Sc., Bordeaux, 1955.
48. Masquelier J., Thèse Sc., Bordeaux, 1948.
49. Masquelier J., *C. R. Acad. Sc.*, 1948, **227**, 643.
50. Masquelier J., *Bull. Soc. Chim.*, 1948, 1175.
51. Masquelier J., *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1949, **31**, 78.
52. Masquelier J., *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1951, **33**, 302.
53. Masquelier J. & Blanquet P., *C. R. Acad. Sc.*, 1947, **227**, 641.
54. Masquelier J. & Blanquet P., *Bull. Soc. Chim.*, 1948, 1172.
55. Masquelier J. & Jensen H., *Bull. Soc. Pharm. Bordeaux*, 1953, **91**, 16.
56. Masquelier J. & Jensen H., *Bull. Soc. Pharm. Bordeaux*, 1953, **91**, 20.
57. Masquelier J. & Jensen H., *Bull. Soc. Pharm. Bordeaux*, 1953, **91**, 105.

58. Masquelier J. & Sansous G., *Bull. Soc. Pharm. Bordeaux*, 1953, **91,** 16.
59. Mentzer C., *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1954, **36,** 1225.
60. Mirande M., *C. R. Acad. Sc.*, 1922, **175,** 429.
61. Onslow M. W., The anthocyanin pigments of plants. 1 vol., University Press., édit., Cambridge, 1925.
62. Parrot J. L. & Galmiche P., *C. R. Soc. Biol.*, 1945, **139,** 948.
63. Parrot J. L., Lavollay J., Sevestre J. & Galmiche P., *C. R. Soc. Biol.*, 1944, **138,** 179.
64. Pautrizel R., Pautrizel-Bézian A. & Tayeau F., *J. Physiol.*, 1950, **42,** 702.
65. Polonovski J. & Macheboeuf M., *Ann. Inst. Pasteur*, 1948, **74,** 196.
66. Randouin L. & Lecoq R., *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1927, **9,** 513.
67. Reichel L. & Schickle R., *Ann. Ch.*, 1942, **553,** 98.
68. Robinson G. M. & Robinson R., *Biochem. J.*, 1933, **27,** 206.
69. Rodney G., Swanson A. L., Wheeler G. N. & Worrel C. S., *J. biol. Chem.*, 1950, **183,** 739.
70. Rosa L. & Cenciotti L., *Arch. sc. med.*, 1950, **89,** 467.
71. Roth L. W. & Shepperd J. M., *Science*, 1948, **108,** 410.
72. Russel A. & Todd J., *J. Chem. Soc.*, 1937, 421.
73. Rygh O. & Rygh A., *Z. physiol. Chem.*, 1932, **204,** 105.
74. Sansous G., Thèse Univ. (Pharm.), Bordeaux, 1952.
75. Schulz K. G., *Bot. Gaz.*, 1931, **90,** 412.
76. Scott-Moncrieff R., *Biochem. J.*, 1930, **24,** 753 et 767.
77. Seastone C. V., *J. exp. Med.*, 1939, **70,** 361.
78. Sevestre J., Fabianck J., Neumann J. & Lavollay J., *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1952, **34,** 135.
79. Sevin A., *C. R. Acad. Sc.*, 1943, **216,** 505.
80. Sperry W. M., *J. biol. Chem.*, 1935, **111,** 467; et 1936, **114,** 125.
81. Sperry W. M. & Stoyanoff V., *J. biol. Chem.*, 1937, **117,** 525; et **121,** 101.
82. Stansbury M. F., Field E. T. & Guthrie J. D., *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 1952, **29,** 370.
84. Sweill L. & Treadwell C. R., *J. biol. Chem.*, 1950, **182,** 479; et **185,** 349.
85. Szent-Györgyi A. & coll., *J. Prat.*, 1942, **1,** 2.
86. Tayeau F., *C. R. Soc. Biol.*, 1939, **130,** 1029; et 1944, **138,** 423. *Bull. Soc. Pharm. Bordeaux*, 1945, **83,** 62 et 89.
87. Tayeau F., *in* Sarthou, Thèse Univ. (Pharm.), Bordeaux, 1941.
88. Tayeau F., *in* Macheboeuf M. & Tayeau F., *Corps gras et Savons*, 1944, **2,** 43.
89. Tayeau F., *Act. Biol.*, 1954, **1,** 633.
90. Tayeau F., *Exp. ann. Biochim. méd.*, 1955, **17,** 213.

91. Tayeau F., Faure E., Neuzil E. & Pautrizel R., *Disc. Faraday Soc.*, 1949, n° 6, 106.
92. Tayeau F. & Marquevielle J., II[e] Congrès intern. Biochimie, Paris, 1952, p. 408.
93. Tayeau F. & Masquelier J., *C. R. Acad. Sc.*, 1947, **224,** 290.
94. Tayeau F. & Masquelier J., *Bull. Soc. Pharm. Bordeaux*, 1947, **85,** 7.
95. Tayeau F. & Masquelier J., *Bull. Soc. Chim.*, 1948, 1167.
96. Tayeau F. & Masquelier J., *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1949, **31,** 72.
97. Tayeau F., Masquelier J. & Lefèvre G., *Bull. Soc. Pharm. Bordeaux*, 1951, **89,** 5.
98. Tayeau F. & Neuzil E., *C. R. Soc. Biol.*, 1946, **140,** 509.
99. Tayeau F., Neuzil E. & Pautrizel R., *C. R. Soc. Biol.*, 1947, **141,** 191.
100. Tayeau F. & Nivet R., *C. R. Acad. Sc.*, 1955, **240,** 567.
101. Tayeau F. & Nivet R., *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1955, **37,** 635.
102. Tayeau F. & Rolland R., *C. R. Soc. Biol.*, 1949, **143,** 394; et *Bull. Soc. Pharm. Bordeaux*, 1950, **88,** 11.
103. Teng-Yi Lo & Chin-Hua Wu, *J. Chinese Chem. Soc.*, 1943, **10,** 58; et *Foods Research*, 1945, **10,** 308.
104. Thimann K. V. & Edmonson Y. H., *Arch. Biochem.*, 1949, **22,** 33.
105. Valette G., *Thérapie*, 1952, **7,** 188.
106. Wawra C. Z. & Webb J. L., *Science*, 1942, **96,** 302.
107. Zacho C. E., *Acta pathol. microbiol. Scand.*, 1939, **16,** 144.
108. Zanoni G., *Bull. Mus. Genova*, 1938, **13,** 65.

TABLE DES MATIÈRES

Pages

AVANT-PROPOS 1

PREMIÈRE PARTIE

Rappel des travaux antérieurs.

CHAPITRE PREMIER. — LE LEUCOCYANIDOL ET SON ANTAGONISTE, LE TANNOÏDE. ETUDE CHIMIQUE 7

Constitution chimique du chromogène 8

Constitution chimique du tannoïde 11

CHAPITRE II. — LOCALISATION DES PIGMENTS ET BIOGENÈSE 13

CHAPITRE III. — PROPRIÉTÉS BIOLOGIQUES DU CHROMOGÈNE LEUCO-ANTHOCYANIQUE 17

DEUXIÈME PARTIE

Etude expérimentale.

CHAPITRE PREMIER. — LE LEUCOCYANIDOL ET LES SUBSTANCES VITAMINIQUES P 23

Conclusions du chapitre premier 27

CHAPITRE II. — ETUDE SPECTROPHOTOMÉTRIQUE DU LEUCOCYANIDOL 28

Conclusions du chapitre II 29

CHAPITRE III. — MISE AU POINT D'UNE TECHNIQUE DE DOSAGE PHYSICO-CHIMIQUE DU CHROMOGÈNE LEUCO-ANTHOCYANIQUE.. 30

Etablissement de la courbe étalon 32

Conclusions du chapitre III 34

Pages

Chapitre IV. — Recherches sur le métabolisme du leucocyanidol 35

Conclusions du chapitre IV 38

Chapitre V. — Etude du pouvoir inhibiteur exercé par le chromogène leuco-anthocyanique vis-a-vis de l'hyaluronidase 39

Mesure de l'activité d'une préparation d'hyaluronidase.... 40

Conclusions du chapitre V 45

Chapitre VI. — Etude du pouvoir inhibiteur exercé par le chromogène leuco-anthocyanique vis-a-vis de l'estérification du cholestérol sérique 46

Conclusions du chapitre VI 48

Chapitre VII. — Action inhibitrice de la vitamine P sur les ions cuivre 49

I. — Détermination de la concentration des ions Cu^{++} la plus favorable à l'oxydation de la vitamine C. 49

II. — Etude de l'oxydation de l'acide ascorbique par les ions Cu^{++} en présence du chromogène et des autres vitamines P 50

Conclusions du chapitre VII 50

Chapitre VIII. — Action du leucocyanidol sur l'acide ascorbique oxydase 52

I. — Préparation de l'acide ascorbique oxydase 52

II. — Définition de l'activité enzymatique 53

III. — Action du leucocyanidol sur l'acide ascorbique en présence d'enzyme 53

Chapitre IX. — Action du leucocyanidol sur la tyrosinase en action sur l'adrénaline 55

I. — Extraction de l'enzyme 55

II. Essais préliminaires 55

III. — Action du chromogène pur non bisulfité sur la tyrosinase 56

IV. — Action du chromogène pur sur la tyrosinase en présence d'adrénaline 57

V. — Action respective des trois vitamines P sur l'oxydation de l'adrénaline par la tyrosinase 57

Conclusions du chapitre IX 57

Pages

Chapitre X. — Action du leucocyanidol sur le sérum sanguin 58

Applications 63

Conclusions du chapitre X 65

Conclusions générales 67

Bibliographie 69

Bordeaux. — Impr. E. Drouillard, place de la Victoire, 3.